

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU

Grade de Docteur d'État en Pharmacie

par

M^{me} J. BLAU-MANOUVRIER

Pharmacien

Diplômée d'Études Supérieures

de Chimie biologique

et de Microbiologie, Sérologie, Hématologie, Parasitologie.

PREMIÈRE THÈSE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE LA PHOSPHATASE
DES GRAINES D'AMANDIER

DEUXIÈME THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le

Juin 1955 devant la Commission d'Examen :

Jury

MM. P. FLEURY, Président,

J. COURTOIS, Professeur,

R. TRUHAUT, Professeur.

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1954-1955

SÉRIE E N° 58

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU

Grade de Docteur d'État en Pharmacie

par

M^{me} J. BLAU-MANOUVRIER

Pharmacien

Diplômée d'Études Supérieures

de Chimie biologique

et de Microbiologie, Sérologie, Hématologie, Parasitologie.

PREMIÈRE THÈSE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE LA PHOSPHATASE
DES GRAINES D'AMANDIER

DEUXIÈME THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le Juin 1955 devant la Commission d'Examen :

Jury { MM. P. FLEURY, Président,
J. COURTOIS, Professeur,
R. TRUHAUT, Professeur.



* * *

MM. René FABRE ... Doyen, C. *, I.
 R. DELABY Assesseur, O. *, I.
 G. CUVIER Secrétaire Général, * I.
 L. JEANDEL ... Secrétaire, I.
 E. EUVAT Commis, I.
 A. QUILLIOT .. Rédacteur.
 Melle. M. DENNY Rédactrice.
 Mme. M.L. ESPINASSE Rédactrice. A.

MM. FABRE, C. *		I.....	Toxicologie.
DELABY, O. *		I.....	Pharmacie chimique.
FLEURY, *		I.....	Chimie biologique.
PICON, O. *		I.....	Chimie minérale.
MASCRE, O. *		I.....	Botanique.
JANOT, *		I.....	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, *		I.....	Chimie organique.
VALETTE, *		I.....	Pharmacodynamie.
BEDEL, *		I.....	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS, *		A.....	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT, *		A.....	Physique.
GAUTIER, *		I.....	Chimie analytique.
LAMBIN (Melle), *		I...	Microbiologie.
RAOUL, *		A.....	Zoologie appliquée.
DOMANGE, *		I.....	Professeur à titre personnel.
CAVIER			Professeur sans Chaire.
MORETTE			Professeur sans Chaire.
TRUHAUT			Professeur sans Chaire.
CRETE, *		A.....	Professeur à titre personnel.
COURTOIS, *		A.....	Professeur à titre personnel.

Doyen honoraire : M. RADAIS C. *,  I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, C. *, I. et
LEBEAU, C. *, I.
membres de l'Institut

BOUGAULT, C. *,  I.
HERISSEY, C. *,  I.
LAUNOY, O. *,  I.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. MOREAU,		A.....	Sciences physiques et chimiques.
GUY			Sciences physiques et chimiques.
GERMAN,		A.....	Sciences naturelles.
PIETTE,		A.....	Sciences naturelles.
QUEVAUVILLER,		A.....	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ,		I.....	Physique.
HARISPE,		A.....	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON			Botanique.
GIRARD,		A.....	Chimie biologique.
MANGEOT,		A.....	T.P. 4ème, année.
RENAULT H.		A.....	Chimie analytique.
DESVIGNES			Microbiologie.
BORY			Sérologie
N			Biologie animale.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL,		A.....	Pharmacotechnie galénique.
WAROLIN			Pharmacotechnie chimique.
N			Pharmacodynamie.

BIBLIOTHEQUE

Conservateur : M. GARNIER, *,  I.

Bibliothécaires : Melle. LAVAUD,  I., Mme. KREHMER.

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Membre de l'Académie de Médecine
Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien honoraire
des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine
Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a fait l'honneur de présider
notre jury de thèse et qui nous a toujours
honorée de son bienveillant intérêt,
en témoignage de respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur J. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a constamment dirigée
au cours de nos recherches,
en témoignage de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur R. TRUHAUT

Professeur sans chaire à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien-chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui a bien voulu faire partie
de notre jury de thèse,
avec l'expression de notre vive gratitude.

A Monsieur le Professeur J. BOUGAULT

Membre de l'Académie de Médecine,
Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie,
de Paris,
Pharmacien honoraire des Hôpitaux de Paris,
Commandeur de la Légion d'Honneur,

qui nous honore depuis de
nombreuses années de son amitié,
en témoignage de mon respectueux
attachement.

A la mémoire de Jacques RICAUD

A Marie-France et à Jean-Jacques RICAUD

A mon Mari,

A ma Famille,

A mes Amis.

INTRODUCTION

* * *

*

L'émulsine d'Amande fut l'un des premiers enzymes découverts. Quatre ans seulement après la découverte de la diastase par PAYEN et PERSOZ, WOHLER et LIEBIG (172) signalèrent son existence en 1837. Ces auteurs remarquèrent que l'amygdaloside était rapidement détruit de 28° à 40° par "l'albumine végétale" des amandes avec formation d'acide cyanhydrique et d'essence d'amande amère. Ils constatèrent que cette action spécifique de l'albumine d'Amande n'est pas provoquée par les albumines de Pois, Haricot et un grand nombre de sucs végétaux.

Après avoir éliminé l'amygdaloside des amandes par épuisement à l'éther, ils traitèrent le résidu par de l'eau. Ils obtinrent une solution opalescente qu'ils dénommèrent solution d'émulsine (Emulsin Auflösung). Cette émulsine dédouble l'amygdaloside, est thermolabile, elle peut être précipitée par l'alcool en donnant une poudre active.

Quelques mois plus tard, ROBIQUET (146) confirmait et complétait ces conclusions et proposait d'appeler synaptase le ferment, nom qui a été employé en France jusque vers la fin du siècle dernier.

L'émulsine d'Amande est l'une des préparations fermentaires qui a été le plus souvent utilisée par les enzymologistes, c'est surtout un réactif précieux dans l'étude des oses et holosides. BOURQUELOT, HERISSEY, BRIDEL et leurs collaborateurs l'ont constamment utilisée pour rechercher les β -glucosides. La α -glucosidase et la β -galactosidase sont les enzymes les plus fréquemment étudiés dans l'émulsine.

A leurs côtés, on a signalé une invertine (fructosidase), une glycuroidase, une xylosidase, une arabinosidase et d'autres enzymes comme l'uréase, la lipase, l'oxynitrilase, etc...

L'émulsine d'Amande est également susceptible d'attaquer les esters phosphoriques.

Nous nous sommes proposés de compléter l'étude de la phosphatase d'Amande en faisant réagir cet enzyme sur divers composés phosphorés. Nous avons recherché si ces composés étaient dédoublés par la même phosphatase ou par des phosphatases distinctes. Dans ce but, nous avons étudié l'influence du pH sur l'hydrolyse des différents substrats.

Parmi ces composés chimiques, notre attention a été attirée par la très forte inhibition que provoque l'acide ascorbique oxydé par les sels cuivriques.

Nous avons été ainsi amenés à étudier l'action des produits d'oxydation de l'acide ascorbique sur la phosphatase d'Amande. D'autre part, nous avons cherché à préciser la nature des substances inhibitrices formées en oxydant l'acide ascorbique par les sels cuivriques.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons étudié l'action inhibitrice de l'acide phytique sur des phosphatases dépourvues d'action phytasique.

Au cours de recherches effectuées parallèlement aux nôtres dans le même laboratoire, R. BARRE a étudié les deux principales fractions protéiques des graines d'Amandes : l'amando-albumine et l'amando-globuline. Il a pu montrer que ces protéines donnaient des combinaisons assez stables avec l'acide phytique, normalement présent dans les graines. Nous avons réussi à préparer un échantillon de phosphatase d'Amande débarrassé d'acide phytique, cette préparation est inhibée par l'acide phytique ; nous avons étudié quelques-unes des modalités de cette inhibition et constaté qu'elle s'observait également avec d'autres phosphatases acides d'origine végétale.

PREMIERE PARTIE

Chapitre premier

L A P H O S P H A T A S E D ' A M A N D E

* * *
*

A notre connaissance, TSCHERNORUTZKY (166) fut le premier à signaler, en 1912, que l'émulsine d'Amande libérait de l'acide phosphorique aux dépens de l'acide nucléinique de levure. BREDERECK et divers collaborateurs (25-27) ont ultérieurement confirmé ce fait.

Les Amandes renferment une polynucléotidase dissociant les polynucléotides en mononucléotides et une nucléotidase libérant l'acide phosphorique des nucléotides ; l'émulsine ne rompt pas la liaison unissant le pentose à la base azotée purique ou pyridinique et l'on peut séparer les nucléosides formés.

HARTMANN et BOSSHARD (96), GULLAND et JACKSON (92) ont utilisé l'émulsine d'Amande comme réactif pour étudier les acides nucléiniques.

SCHLENCK, GUNTHER et EULER (156) ont montré que l'émulsine attaque la cozymase : dans un premier stade la liaison pyrophosphorique qui unit le nucléotide à adénine au nucléotide à amide nicotinique est rompue par une nucléase ; la nucléotidase libère ensuite l'acide orthophosphorique des deux nucléotides formés, les nucléosides d-ribose-adénine et d-ribose-amide nicotinique ne sont pas hydrolysés. HEIWINKEL (97) a publié des résultats identiques.

BREDERECK et GEYER (26) ont identifié une phosphamidase dans l'émul-

sine, cet enzyme hydrolyse des phosphamides comme l'anilide de l'acide phénylphosphorique (I) et la p-chloranilide de l'acide phosphorique (II).



La phosphatase d'Amande est susceptible d'hydrolyser différents mono-esters orthophosphoriques : fructosediphosphate de HARDEN et YOUNG (HARDING (95)), β -glycérophosphate (FERNANDEZ et PIZARROSO (71)), α -glycérophosphate (COURTOIS (32)), ester phosphorique de l'aldéhyde glycolique ou diosephosphate (FLEURY et PARIS (84)), FLEURY et COURTOIS (78)), acide phosphoglycolique (FLEURY et COURTOIS (77)), les n-propyl et isopropylorthophosphates (COURTOIS et DENIS (50)). Elle dédouble assez difficilement l'ester glucose-I-phosphorique (ester de Cori) (FLEURY, COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et DESJOBERT (81)).

Ces auteurs ont également constaté que la phosphatase d'Amande pouvait hydrolyser un certain nombre d'esters phosphoriques azotés : esters monorthophosphoriques de l'aminoéthanol, de la choline et du morpholinoéthanol.

Tandis que les phosphatases alcalines du rein et du foie de Boeuf et des os de Veau hydrolysent à des vitesses assez voisines le glycérophosphate et les esters azotés, l'on observe de nettes divergences avec les phosphatases acides. Par contre, la phosphatase d'Amande dédouble beaucoup plus rapidement le glycérophosphate que ces esters azotés.

Il a été également décelé dans l'émulsine d'Amande une pyrophosphatase active sur le pyrophosphate de sodium (FLEURY et COURTOIS (75)).

FOLLEY et KAY ont proposé une classification des phosphomonoestérases basée sur leur pH optimum, leur action sur les α et β -glycérophosphates et l'influence accélératrice ou inhibitrice de certains composés chimiques. Cette classification a été reprise dans son ensemble par J. ROCHE et J. COURTOIS (148) qui proposent de distinguer :

- La phosphatase I surtout répandue chez les Mammifères : rein, foie, os, sérum sanguin ; son pH optimum se situe vers 8-9-0 ; elle est très fortement

activée par les sels de magnésium, assez fortement inhibée par le phloridzoxide et les hétérosides voisins, peu ou pas inhibée par les fluorures.

- La phosphatase II est beaucoup moins répandue chez les Mammifères ; on rencontre cependant une phosphatase faiblement active de ce type dans le rein, le foie, le sérum sanguin.

Par contre, la prostate, le muscle, le sperme et l'urine renferment presque exclusivement, sinon exclusivement de la phosphatase II, celle de la prostate est très active. La phosphatase II est, par contre, très répandue chez les végétaux supérieurs : fleurs, feuilles, tubercules et particulièrement les graines.

Les graines huileuses ont, à poids égal, une activité phosphatasique bien supérieure à celle des graines amylacées. On a trouvé cette phosphatase II chez les Basidiomycètes.

D'une façon générale, ces phosphatases II de diverses origines présentent comme caractères communs : pH optimum aux alentours de 5,0-5,6 ; les sels de magnésium n'exercent aucune activation et, à partir d'une certaine concentration, sont même légèrement inhibiteurs. De petites doses de fluorure de sodium provoquent une très forte inhibition ; le phloridzoxide et les hétérosides voisins n'ont pas d'action.

- La phosphatase III a été signalée chez les Ascomycètes (*Aspergillus* en particulier) et chez les Basidiomycètes ; elle a été retrouvée dans certaines préparations d'origine animale : foie, hématies. Son pH optimum se situe vers 3,6 à 4,0. Elle est nettement inhibée par les fluorures et faiblement inhibée par le phloridzoxide. COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et KHORSAND (52) (44) (108) ont caractérisé une phosphatase du type III dans les feuilles. Cet enzyme solidement fixé aux tissus est activé par divers cations bivalents en particulier le magnésium.

Les phosphatases III d'origine animale sont, au contraire, assez nettement inhibées par les sels de magnésium.

- La phosphatase IV est la moins répandue des phosphatases, on la rencontre dans la levure et surtout dans les hématies où elle a fait l'objet d'une belle série de recherches par J. ROCHE et ses élèves. Son pH optimum est vers

6,0 - 6,5 ; elle est activée par les sels de magnésium, inhibée par les fluorures et le phloridzoxide.

J. COURTOIS (32) étudiant l'action de la phosphatase d'Amande sur les α et β -glycérophosphates a constaté qu'elle se comportait comme une phosphatase II : pH optimum 5,4 - 5,6 qui semble indépendant de la plus ou moins grande purification de l'enzyme, aucune activation par l'ion Mg^{++} mais légère inhibition avec de fortes quantités de sel de magnésium, très nette inhibition par le fluorure de sodium, inhibition qui croît avec la concentration du substrat.

Nous avons cherché si nous pouvions retrouver ces caractères avec d'autres substrats.

----- oOo -----

Chapitre II

TECHNIQUE D'ETUDE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE

* * *
*

I - S U B S T R A T S -

Le monométhylphosphate a été préparé par la technique de O.BAILLY (9) et par celle de CAVALIER (29)⁽¹⁾ ; les allyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, et isobutyl mono-orthophosphates ont été préparés par la technique de CAVALLIER (29) : action de l'anhydride phosphorique sur l'alcool mélangé à l'éther; ce mélange, refroidi, est additionné de l'anhydride phosphorique ajouté par petites portions en agitant, la solution est neutralisée par du carbonate de baryum, puis de la baryte ; après filtration et concentration du filtrat, le monoester de baryum moins soluble que le diester qui s'est également formé, est précipité par chauffage. Les sels alcalino-terreux des monoesters phosphoriques ont, en effet, un coefficient de solubilité négatif et se trouvent de ce fait plus solubles à froid qu'à chaud. Nous avons purifié le sel de baryum précipité à chaud par reprise à l'eau froide en agitant mécaniquement et nouvelle précipitation à chaud.

Le glycolphosphate a été préparé selon la technique de BAILLY (9) en faisant réagir la monochlorhydrine du glycol sur le phosphate trisodique.

Le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium ont été purifiés par recristallisations des sels du commerce.

L'acide diphenylphosphorique nous a été obligeamment fourni par M. le Professeur J. ROCHE à qui nous exprimons nos respectueux remerciements.

(1) Nous remercions M. O.BAILLY et Mlle M.C. BAILLY qui ont eu l'obligeance de nous procurer une partie du méthylphosphate et les glycérophosphates utilisés au cours de nos recherches.

Le triphénylphosphate a été purifié par recristallisations dans le chloroforme du sel commercial.

L'hexosediphosphate de calcium utilisé provenait de la firme BAYER (Candioline). Ce corps, qui est le fructo-furanose 1-6 diphosphate, avait été préparé par synthèse biochimique, la levure réagissant en milieu toluéné sur le saccharose en présence de phosphates.

Par hydrolyse oxalique de l'hexosediphosphate, l'acide phosphorique fixé en 1 est éliminé ; nous avons préparé ainsi, selon le protocole opératoire de NEUBERG (126), l'ester fructo-furanose-6-phosphorique ou ester de NEUBERG.

Nous avons, en outre, utilisé du nucléinate de sodium du Codex et l'inositohexaphosphate du Codex ; à partir de ce dernier, nous avons pu également préparer du phytate de sodium selon la technique de POSTERNAK (142).

La pureté de tous ces corps a été vérifiée par détermination de leur teneur en phosphore organique et, pour les sels de baryum, en métal alcalino-terreux.

Dans tous les essais d'hydrolyse phosphatasique nous avons utilisé une solution de sel sodique d'ester phosphorique, les sels de baryum ont été décomposés par la quantité théorique d'une solution de carbonate de sodium à l'ébullition.

Avec le n-butylphosphate et l'ester de NEUBERG, nous avons précipité le baryum par la quantité théorique d'acide sulfurique titré en triturant le corps avec ce dernier au mortier, puis en portant à la machine à agiter ; après filtration, la solution est neutralisée avec de la soude en présence de phtaléine.

Pour l'hexosediphosphate de calcium, nous avons opéré de même en substituant l'acide oxalique à l'acide sulfurique.

Enfin, l'acide diphénylphosphorique a été dissous dans la quantité théorique de soude.

Nous avons déterminé la teneur en ester de ces deux solutions en dosant 10/- l'acide phosphorique minéral présent en faibles traces ;

2°/- le phosphore total après minéralisation, soit par évaporation dans un creuset en présence d'acide nitrique et de nitrate de magnésium, puis calcination au moufle, soit par destruction sulfo-nitrique dans une fiole de Kjeldahl.

Dans les deux cas, le phosphore a été dosé par la méthode de COPAUX.

II - PREPARATIONS D'ENZYMES UTILISEES.-

Nous avons employé de l'émulsine d'Amande douce préparée selon la technique de HERISSEY (99).

Dans les recherches sur les produits d'oxydation de l'acide ascorbique effectuées en 1941-1942, nous avons utilisé une autre émulsine.

Comme il était devenu très difficile de se procurer des Amandes douces, nous avons réservé ces dernières pour continuer les recherches amorcées en 1938.

Nous avons utilisé, dans les essais décrits dans la deuxième partie, de l'émulsine d'Amande amère préparée au laboratoire de M. HERISSEY par M. THEPENIER, en 1939.

Enfin dans la dernière partie de ce travail réalisée en 1951-1952, nous avons utilisé soit la poudre d'Amandes douces délipidée, soit une préparation phosphatasique obtenue à partir de cette poudre en relargant par le sulfate d'ammonium pour éliminer l'acide phytique.

Le protocole opératoire que nous avons suivi pour obtenir ces préparations sera décrit dans la 3ème partie avant la relation de nos essais.

Dans tous les essais, des deux premières parties, nous avons utilisé une suspension d'émulsine à 1 % préparée en triturant au mortier la poudre sèche dans de l'eau distillée toluénée, puis en agitant mécaniquement la suspension pendant deux heures ; cette suspension passée sur coton est conservée à la glacière.

III - PROTOCOLE DES ESSAIS -

Le substrat est amené au pH désiré par addition d'acide citrique ou

d'acide sulfurique dilué. Dans les essais de la première partie de ce travail le milieu est tamponné par une solution acide citrique-citrate de sodium.

Dans les recherches exposées dans la deuxième partie de ce travail, lorsque nous introduisons des substances acides ou alcalines dans le milieu, particulièrement dans les recherches sur l'acide ascorbique et ses produits d'oxydation, nous avons ajouté la quantité d'acide ou d'alcali nécessaire pour amener la substance ajoutée au même pH que la solution de substrat tamponné suivant, qui est à pH 5,2.

β -glycérophosphate disodique	6 gr. 10
Acide acétique 2N	8 cm ³
Tampon acide acétique-acétate de sodium (1)	200 cm ³
Eau Q. S. pour	500 cm ³

A 20 cm³ de ce substrat, nous avons ajouté 5 cm³ d'émulsine à 1 %, complété à 50 cm³ et maintenu vingt-quatre heures à 37°.

Avec les autres substrats, nous avons opéré de façon variable ; nous préciserons chaque fois les conditions opératoires.

Avec tous les esters phosphoriques, l'acide phosphorique a été dosé par la technique mise au point par J. COURTOIS dans ses recherches sur les phosphatases végétales (32). 50 cm³ de liquide ayant subi l'hydrolyse phosphatase sont additionnés de 20 cm³ de mixture magnésienne (nitrate de magnésium, cristallisé, 50 gr. ; nitrate d'ammonium, 100 gr. ; eau, quantité suffisante pour 1.000) et 10 cm³ d'un mélange à volumes égaux d'acide cristallisable et d'acétate d'ammonium du Codex.

On porte une demi-heure sur le bain-marie bouillant, l'enzyme est inactivé et les protéines flocculées.

La solution encore chaude est filtrée sur papier ; cette filtration est très rapide. Le flacon et le filtre sont lavés avec 10 cm³ d'eau, le filtrat est alors additionné d'ammoniaque jusqu'à coloration violet franc de la phénol-phtaléine. Le phosphate ammoniaco-magnésien précipité après

(1) Acide acétique 2 N : 100 cm³ ; soude normale : 150 cm³.

vingt-quatre heures est, en général, adhérent aux parois du flacon ; nous recueillons le précipité non adhérent sur un filtre, lavons à l'eau ammoniacale. Nous versons alors 5 cm³ d'acide nitrique et 10 cm³ d'eau dans le flacon, le phosphate ammoniaco-magnésien se dissout, nous faisons passer sur le filtre et lavons l'ensemble avec 15 cm³ d'eau.

La solution acide est introduite dans une ampoule de COPAUX, émulsionnée vigoureusement avec 8 cm³ d'éther, puis additionnée de 10 cm³ de molybdate de sodium à 10 %⁽¹⁾ en acide molybdique. Nous agitons énergiquement et centrifugeons. La quantité de phosphore minéral est calculée d'après le volume occupé par le complexe phospho-aquéo-éthéro-duodécimolybdique.

Le tube de COPAUX a été préalablement calibré avec une solution titrée de phosphate. En pratique, 1/20^e de centimètre cube de complexe correspond sensiblement à 1 millgr. de P₂ O₅.

La teneur en P₂ O₅ minéral de l'enzyme est déterminée par un essai témoin, elle était négligeable dans les préparations enzymatiques que nous avons utilisées.

Un autre essai identique, mais sans enzyme, permet de fixer la quantité de phosphore minéral préexistant dans le substrat ou libéré par séjour à l'étuve ou au cours de la défécation. Cette quantité était insignifiante avec la plupart des corps étudiés ; cependant, le nucléinate de sodium renfermait une certaine quantité de phosphore minéral et l'hexosediphosphate possédant une fonction ester au voisinage de la fonction cétonique est assez labile et il y a toujours un peu de phosphore libéré par séjour à l'étuve et au cours de la défécation.

Avec tous les autres substrats, nous avons pu doser sans difficulté l'acide phosphorique libéré par cette technique. Trois corps ont cependant nécessité des précautions supplémentaires :

- a)- La plupart des substrats non hydrolysés ne précipitent pas par la mixture magnésienne ; mais l'hexosediphosphate et les inosito-phosphates sont cependant

(1) Solution à titre stable préparée en neutralisant à chaud 100 gr. d'acide molybdique par 60 gr. de carbonate de sodium desséché et complétant à 1.000 cm³ avec de l'eau.

insolubilisés dans ces conditions et précipitent en même temps que le phosphate ammoniac-magnésien. Ils sont redissous dans l'acide nitrique dilué et, aux concentrations où nous avons opéré, n'entravent pas la précipitation du complexe étheré dans l'ampoule de COPAUX.

- b)- L'acide nucléinique précipité au cours de la défécation reste en partie sous forme colloïdale et traverse le filtre ; il est insolubilisé par la mixture magnésienne et solubilisé dans l'acide nitrique, il fournit un précipité amorphe par addition de molybdate. Nous nous en sommes débarrassé par une double précipitation magnésienne de l'acide phosphorique ; le précipité, repris par l'acide nitrique, est additionné de mixture magnésienne et alcalinisé par l'ammoniaque ; après vingt-quatre heures, le phosphate ammoniac-magnésien est séparé et redissous dans l'acide nitrique ; l'acide nucléinique est ainsi presque totalement éliminé et n'entrave plus le dosage par la méthode de COPAUX.

Avec les pyrophosphates, nous avons suivi un protocole opératoire légèrement différent : le pyrophosphate non hydrolysé est précipité à l'état de sel magnésien insoluble lors de la défécation des protéines ; dans ces conditions, le précipité ne retient que des quantités négligeables d'orthophosphates (COURTOIS (34), FLEURY et COURTOIS (75)).

Nous opérons donc de la même façon que pour les esters phosphoriques, mais, lors de la défécation, nous augmentons la concentration du milieu en sels de magnésium en ajoutant à la mixture magnésienne et au tampon acétique 3 cm³ de solution saturée de nitrate de magnésium.

Il convient, en présence de pyrophosphates, d'éviter le plus possible l'hydrolyse de ces sels ; c'est pourquoi il est indispensable de filtrer la solution chaude après défécation et neutraliser aussitôt le filtrat.

Au cours des essais en présence des composés chimiques étudiés, notre technique nous a toujours donné satisfaction ; en présence de bleu de méthylène, nous avons éliminé ce dernier du précipité avec le phosphate ammoniac-magnésien par un lavage à l'alcool-ammoniacal.

En présence d'acide ascorbique, notre technique permet d'éviter les causes d'erreur provoquées par l'action réductrice de cette vitamine sur les molybdates ; cette réduction peut entraîner de notables erreurs par excès dans

le micro-dosage colorimétrique du phosphore, comme l'ont signalé KING et DELORY (110).

Par ailleurs, nous n'avons observé aucune action hydrolysante de l'acide ascorbique sur le substrat, action qui se manifesterait en milieu fortement acide (THANNHAUSER-REICHEL et GRATTAN (165)).

Pour terminer, nous signalerons que, dans certains essais, le phosphate ammoniaco-magnésien se trouvant en faibles quantités, nous l'avons dosé après redissolution dans l'acide nitrique par la technique de MISSON, modifiée par FLEURY et LECLERC (83).

Le phosphore est engagé dans un complexe phosphomolybdovanadique dont la teinte jaune est comparée au colorimètre avec un témoin préparé à partir d'une solution titrée en phosphore. Nous avons réalisé ces mesures colorimétriques à l'électrophotomètre de Dognon avec l'écran bleu.

----- oOo -----

Chapitre III

ACTION DE LA PHOSPHATASE D'AMANDE EN FONCTION DU pH SUR DIVERS SUBSTRATS.

* * *
*

Nous avons déterminé l'activité de la phosphatase en fonction du pH sur divers substrats.

Nous avons utilisé comme substrats des monoesters, un diester le diphénylphosphate, le nucléinate de sodium et le triphénylphosphate.

I - ACTION SUR DIVERS MONOESTERS -

La solution sodique du monoester est additionnée de 5 cm³ de citrate de sodium à 5 % et acidifiée par des quantités variables d'acide sulfurique normal. Le pH du milieu est ainsi maintenu fixe par les deux systèmes tampons coexistants : le système acide citrique-citrate de sodium et l'ester phosphorique plus ou moins complètement salifié. Nous avons déterminé le pH du milieu par colorimétrie à l'aide de la technique de GUILLAUMIN.

Dans une première série d'essais, nous avons mis à réagir pendant six heures, à 37°, 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 %, 20 cm³ de substrat M/6 (soit 236 milligr. de P205) et de l'eau Q.S. pour 50 cm³.

Nous ne pouvons donner en détail nos chiffres expérimentaux, car le cahier les contenant a dû être abandonné à Rethel, en Mai 1940, par M. COURTOIS à qui nous l'avions confié. Mais en 1939, nous avons publié avec ce dernier (54) l'essentiel des résultats obtenus.

Au pH où se manifestait la plus forte hydrolyse, le glycol-phosphate (pH 5,8) a libéré 29 milligr. de P₂O₅, l'allylphosphate (pH 5,4) 25 milligr.,

le méthylphosphate (pH 5,6) 24 milligr., le n-butylphosphate (pH 5,6) 23 milligr.

Les pH optima et les pourcentages d'hydrolyse des divers substrats sont donc très voisins, quoique le radical carbone soit assez différent. Le glycolphosphate, qui renferme une fonction alcool, et l'allylphosphate, qui possède une liaison éthylénique, sont hydrolysés un peu plus rapidement que les deux esters d'alcools dérivant des carbures saturés.

Nous avons poursuivi nos essais, par la suite, avec une nouvelle préparation d'émulsine que nous avons fait réagir sur l'isobutylphosphate, l'ester de NEUBERG et l'ester de HARDEN et YOUNG (Hexosediphosphate).

20 cm³ d'isobutylphosphate M/10 sont additionnés de 5 cm³ de citrate de sodium à 5 %, de 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % d'eau distillée et d'acide sulfurique N/10 Q.S. pour 50 cm³ ; nous avons dosé l'acide phosphorique libéré après six heures de contact à 37°.

L'ester de NEUBERG étant un substrat fort long à préparer, nous avons utilisé une plus faible dose de substrat : 2 cm³ de substrat M/15 sont mélangés à 5 cm³ de citrate de sodium à 5 % ; nous amenons au pH voulu par addition d'acide sulfurique N/10, ajoutons 1 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % et complétons à 20 cm³. Après un contact de vingt-quatre heures à 37° l'acide phosphorique libéré est séparé sous forme de sel ammoniaco-magnésien puis titré colorimétriquement par la technique de MISSON.

Avec l'ester de HARDEN et YOUNG, nous avons mis en contact 20 cm³ de ce substrat M/50, 5 cm³ de citrate de sodium à 5 %, 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 %, une quantité variable d'acide sulfurique normal et de l'eau Q.S. pour 50 cm³ ; l'hydrolyse a été poursuivie pendant vingt-quatre heures à 37°.

Les résultats des essais avec les trois substrats forment la matière du tableau I. Ils nous ont permis de tracer les courbes ci-jointes.

Comme avec les monoesters précédents, le pH optimum se situe vers 5,4 - 5,8.

Toutes ces courbes d'activité en fonction du pH présentent la même allure : optimum relativement peu saillant, activité presque en plateau à partir de pH 4,5 et chute assez brusque de 5,8 à 6,5.

TABLEAU I - ACTIVITE EN FONCTION DU pH -

<u>pH</u>		<u>milligr. de P₂ O₅ libérés</u>
<u>Isobutyl phosphate</u>		
3,4		0
3,8		0,5
4,6		3,2
5,0		3,2
5,4		3,75
5,6		4,0
5,8		3,0
7		1,5
<u>Ester de NEUBERG</u>		
3,5		Traces
3,7		Traces
4,2		1,8
5		4,5
5,6		5,0
5,8		5,3
6,0		3,5
6,2		2,0
6,8		0,6
7,6		0
<u>Ester de HARDEN et YOUNG</u>		
4,5		9,0
5,2		10,5
5,6		10,5
5,8		10,0
6,1		8,0
6,3		7,0
6,5		6,0

Avec les acides α et β glycérophosphoriques, J. COURTOIS (32) avait eu des courbes d'activité en fonction du pH présentant le même aspect.

FLEURY et COURTOIS (77, 78) ont obtenu des résultats analogues avec l'acide phosphoglycolique et le diosephosphate.

En aucun cas, nous n'avons pu déceler d'activité phosphatasique en milieu alcalin (1).

Ainsi, avec les monoesters les plus divers, les courbes d'activité en fonction du pH sont semblables ; ce fait plaide en la faveur de l'existence d'une seule monoestérase II susceptible de dédoubler ces divers corps.

Nous avons fait quelques études complémentaires au cours des essais avec l'ester de HARDEN et YOUNG qui est l'acide fructofuranose 1,6 diphosphorique de formule

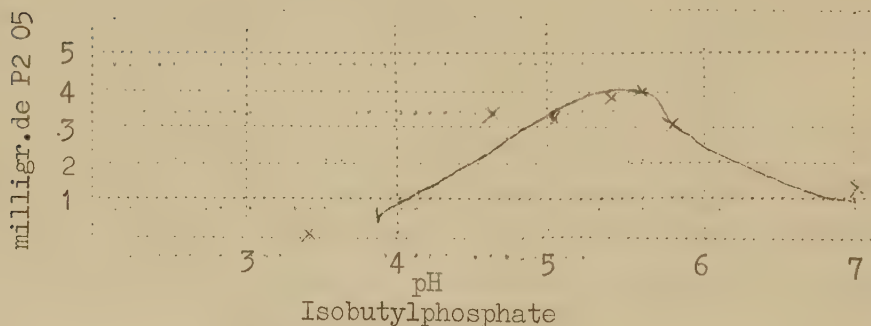
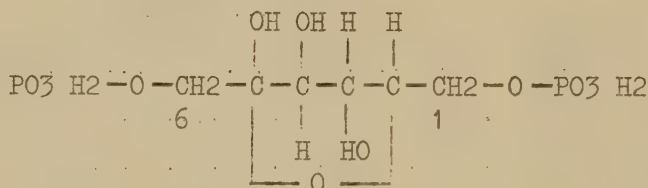
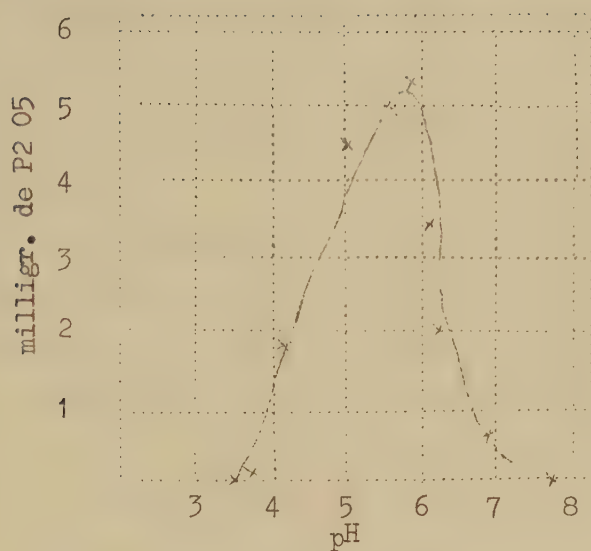


Fig. 1

(1) Nous discuterons dans la IIIe partie de l'éventualité de l'existence d'une phosphatase alcaline masquée par l'acide phytique présent dans l'émulsine.

Les préparations phosphatasiques privées d'acide phytique ne contenaient pas de phosphatase alcaline.

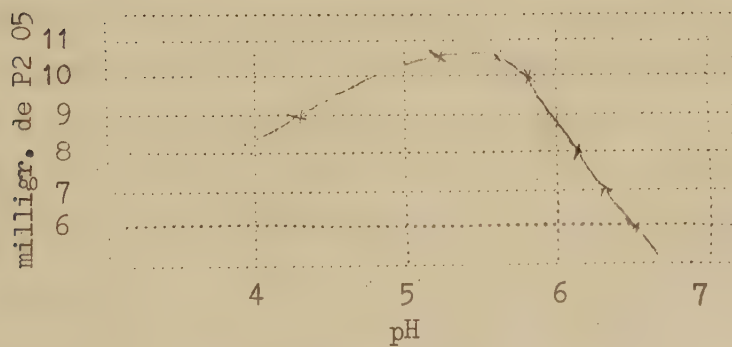


Ester de Neuberg

Fig. 2

Ce corps peut être attaqué par divers enzymes (COURTOIS (33)).

La zymohexase le rompt au milieu de sa chaîne carbonée et donne une molécule d'ester phosphorique de la dioxyacétone et une d'ester phosphorique de l'aldéhyde glycérique.



Ester de Harden et Young

Fig. 3

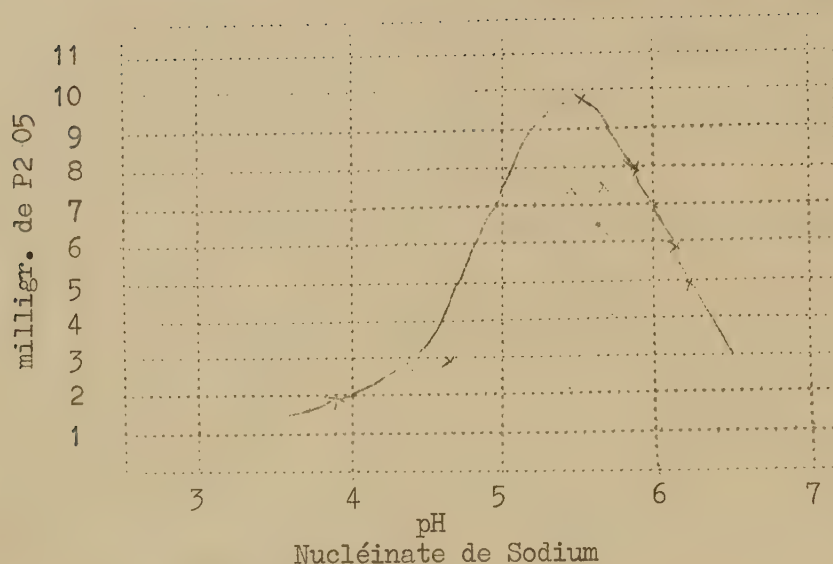


Fig. 4

La phosphatase peut hydrolyser soit l'une soit l'autre des deux liaisons ester phosphorique.

Lorsque la liaison en 6 est rompue, on obtient l'ester de TANKO-ROBINSON : fructofuranose-I-phosphorique.

Si, au contraire, l'acide phosphorique relié au carbone I est éliminé, il se forme l'ester de NEUBERG fructofuranose-6-phosphorique. Ce dernier peut être soit déphosphorylé par la phosphatase, soit transformé réversiblement par la phospho-hexokinase en esters d'aldoses : le glucopyrranose-6-phosphate ou ester de ROBINSON et le mannose-6-phosphate.

Nous avons fait quelques essais pour rechercher si l'émulsine renfermait de la zymohexase et de la phosphohexokinase.

50 cm³ d'hexosediphosphate M/50 sont amenés à pH 5,6 ; nous ajoutons au mélange soit 5, soit 10 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % et complétons à 100 cm³. Après un temps de contact variable à 37°, nous dosons :

- 1°/- Sur une prise d'essai de 10 cm³ l'acide phosphorique libéré selon notre technique habituelle.
- 2°/- Les fonctions cupro-réductrices libérées. Les trois enzymes peuvent donner naissance à des substances réduisant la liqueur de Fehling. Nous avons

effectué ce dosage par la technique de LEHMANN modifiée par FLEURY et BOUTOT (74). Nous exprimons nos résultats en fructose, en utilisant la table établie pour ce sucre par AMBERT (3).

Nous avons déterminé l'action de 20 cm³ de notre solution sur le réactif cupro-sodique.

3°/- Si notre préparation renferme de la zymohexase, il devra se former des substances réduisant à froid le réactif de NESSLER : l'ester de l'aldéhyde glycérique est réducteur et celui de la dioxyacétone devrait également réduire le réactif de NESSLER, car il possède un groupe CO-CH₂ OH (SCHUSTER (157)).

Nous avons mis en contact 20 cm³ de solution avec 7 cm³,5 de solution mercurielle formule PARIS (134) et 10 cm³ de soude à 30 % en poids.

Après une heure de contact à la température ordinaire, la solution est acidifiée et le mercure réduit titré par iodométrie selon le protocole habituel. Nous exprimons nos résultats en aldéhydes M/10, 2 cm³ d'iode décinormal correspondant à 1 cm³ d'aldéhyde M/10.

4°/- La zymohexase donnerait naissance à un sucre aldéhydique : l'ester phosphorique de l'aldéhyde glycérique ; la phosphohexokinase a deux autres esters d'aldoses : ceux du glucose et du mannose.

Nous avons cherché à doser ces aldoses par l'hypoiodite par la technique de BOUGAULT et PAUCHARD (23 et 135) : 20 cm³ de notre mélange sont additionnés de 10 cm³ d'iode décinormal et de 10 cm³ de solution de carbonate de sodium cristallisé à 15 %. Après contact de trente minutes à la glacière, la solution est acidifiée par de l'acide chlorhydrique ; nous titrons l'iode en excès par l'hyposulfite décinormal. Nous exprimons nos résultats également en aldéhydes M/10, 2 cm³ d'I N/10 correspondant à 1 cm³ d'aldéhyde M/10.

Tous ces essais ont été effectués après des durées variables d'hydrolyse et sur la solution initiale. Nos résultats sont ramenés aux 100 cm³ de mélange réactionnel et sont consignés dans le tableau II.

TABEAU II - ACTION DE LA PHOSPHATASE SUR L'ESTER DE HARDEN ET YOUNG

Durée de la réaction	Centimètres cubes de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ M/10	Centimètres cubes de fructose M/10	Aldéhydes M/10	
			par mercurimétrie	par l'hypoiodite
Nulle	0	3	4,5	5,0
24 heures	1,4	3,7	5,5	5,5
3 jours	5,0	5,2	8,75	4,5
6 jours	10,7	5,75	9,25	4,25

Après six jours à 37° , la solution témoin provoquait une réduction du cuivre correspondant à 4 cm³ de fructose M/10 et contenait 1,25 cm³ d'acide phosphorique M/10. Après six jours de contact avec l'enzyme, la solution correspondant à 10 cm³ d'hexosediphosphate M/10 a subi une hydrolyse phosphatasique un peu supérieure à 50 % : 10,7 cm³ de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ M/10 libérés sur les 20 cm³ que fournirait l'hydrolyse totale. L'augmentation du pouvoir cupro-réducteur, 2,75 cm³ exprimée en fructose M/10, est plus faible que la libération du phosphore ; il est donc vraisemblable que l'hexosediphosphate a été en partie déphosphorylé, en ester de NEUBERG dont le pouvoir réducteur est inférieur à celui du fructose (COURTOIS (33)). L'action du réactif de NESSLER fournit peu d'indications car l'hexosediphosphate le réduit déjà notablement et nous ne connaissons pas l'action mercuro-réductrice à froid des esters de NEUBERG et TANKO-ROBINSON qui peuvent se former.

Par contre, aux erreurs d'expérience près, l'oxydabilité par l'hypoiodite est demeurée constante ; il ne s'est donc pas formé d'aldéhydes et les deux enzymes qui auraient pu donner naissance à des aldéhydes : la zymohexase et la phosphohexokinase ne paraissent pas être présents dans l'émulsine.

II - ACTION SUR LE NUCLEINATE DE SODIUM -

20 cm³ de nucléinate de sodium du Codex M/20 en phosphore organique (ce corps renferme une quantité non négligeable de phosphore minéral) sont mélangés à 5 cm³ de citrate de sodium à 5 %, 5 cm³ de suspension d'émulsine

à 1 % et de l'acide sulfurique dilué Q.S. pour 50 cm³.

Nous dosons l'acide phosphorique libéré en vingt-quatre heures à 37°. Nos résultats sont groupés dans le tableau III.

TABEAU III - HYDROLYSE DU NUCLEINATE DE SODIUM A DIVERS pH -

<u>pH</u>	<u>Milligr. de P2 O5 libérés</u>
3,9	2,0
4,4	3,0
4,6	3,0
5,2	7,0
5,4	7,5
5,5	10,0
5,6	7,5
5,8	8,0
6,2	6,0
6,3	5,0

Comme nous pouvions le prévoir d'après les recherches de BREDERECK et ses élèves, le nucléinate de sodium est hydrolysé par l'émulsine ; la courbe d'activité en fonction du pH est identique à celle des monoesters et il est vraisemblable que la même phosphatase hydrolyse ces divers substrats.

III - ACTION SUR LE PHYTATE DE SODIUM -

Nous avons préparé du phytate de sodium par la technique de POSTERNAK (142).

Nous avons entrepris nos essais avec ce corps cristallisé dont nous avons vérifié la pureté par un dosage de phosphore organique. Il n'a pas été hydrolysé par l'émulsine ; l'addition de sels de magnésium n'a pas modifié les résultats.

Nous pensions avoir en mains une préparation enzymatique où la phytase avait été inactivée, mais il nous a été impossible d'hydrolyser le phytate de sodium par un autre échantillon d'émulsine à forte activité phosphatasique ou

même par un lait d'Amandes douces débarrassé de la "caséine végétale" par addition d'acide acétique et filtration.

Nous n'avons pas introduit d'inhibiteur des phosphatases au cours de notre purification car, dans un mélange phytate et glycérophosphate de sodium, la phosphatase d'Amande hydrolyse le glycérophosphate.

Nos résultats fragmentaires montrent cependant que la phosphatase d'Amande hydrolyse le glycérophosphate de sodium sans toucher au phytate de sodium, mais nous avons remarqué que l'hydrolyse du glycérophosphate était ralentie en présence d'acide phytique. L'étude de cette inhibition sera examinée en détail dans la troisième partie.

IV - ACTION SUR UN DIESTER -

Nous avons eu recours à l'acide diphenylphosphorique. 5 cm³ de substrat M/10 (renfermant 35,5 milligr. de P₂ O₅ organique), sont mélangés avec 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 %, 5 cm³ de ----- citrate de sodium à 5 %, de l'acide sulfurique M/10 pour amener au pH voulu et de l'eau Q.S. pour 20 cm³.

Après vingt-quatre heures à 37°, nous n'avons observé aucune hydrolyse. Nous avons alors effectué une série d'essais en prolongeant le temps de contact avec l'enzyme. Après sept jours à 37°, nous avons dosé les quantités suivantes de P₂ O₅.

TABLEAU IV - ACTION DE LA PHOSPHATASE D'AMANDE SUR LE DIPHENYLPHOSPHATE

<u>pH</u>	<u>Milligr. de P₂ O₅</u>
3,7	0,75
4,6	2,0
5,0	3,5
5,6	2,4
5,7	2,5
6,3	2,9
6,8	2,6

Dans deux essais témoins sans enzyme, nous avons obtenu, après sept jours à 37°, 0,6 milligr. de P2 O5 à pH 3,5 et 1,17 milligr. à pH 6,0.

L'hydrolyse phosphatasique est à peine supérieure à l'hydrolyse propre du substrat ; en déduisant l'hydrolyse propre du substrat à pH 6,3 il y a au maximum 4 % du diphénylphosphate décomposé en une semaine.

Avec une autre préparation d'émulsine, 0 gr., 05 de cet enzyme ont libéré 1,6 milligr. de P2 O5 à pH 4,6 en sept jours à 37°.

Nos résultats ne permettent pas d'affirmer qu'il n'y ait aucune hydrolyse du substrat, mais ces hydrolyses sont tellement infimes comparativement à celles des monoesters, que nous pouvons considérer que l'émulsine d'Amande est pratiquement privée de phosphodiesterase. Il est d'ailleurs à peu près admis généralement que les diesters sont hydrolysés par des enzymes distincts des monoestérases.

Les diesters sont toujours plus lentement hydrolysés que les monoesters ; on a cependant pu faire disparaître l'action sur les diesters de préparations encore actives sur les monoesters.

ROCHE et Mme LATREILLE (149) ont préparé par la technique d'ALBERS de la phosphatase rénale ; cette opération très pure, adsorbée sur kaolin en milieu acide et éluée par l'ammoniaque, hydrolyse rapidement les α et β glycérophosphates, lentement le monophénylphosphate et se révèle sans action sur le diphénylphosphate.

SCHAFFNER et BAUER (155) ont obtenu une préparation phosphatasique de levure hydrolysant les monoesters, mais sans action sur le diphénylphosphate ; NGUYEN VAN THOAI (131) a montré qu'à pH 3,2 la phosphatase III d'Armillaria mellea (Basidiomycètes) hydrolysait fort bien les α et β glycérophosphates et demeurerait sans action sur les diéthyl et diphénylorthophosphates.

Le même champignon contient une phosphatase II associée qui, à pH 5,0, hydrolyse tous ces substrats.

Enfin, COURTOIS et BIGET (47) ont observé dans ce laboratoire que la phosphatase II de l'urine hydrolyse les α et β glycérophosphates ; elle est, par contre, sans action sur le diphénylphosphate. Nous avons utilisé le même substrat que ces auteurs ; cet échantillon de substrat ne renferme pas

d'inhibiteur de la diestérase car il est hydrolysé par le liquide fermentaire d'Aspergillus orizae.

Par la suite, J. COURTOIS (40) n'a pu observer d'hydrolyse de l'acide diphénylphosphorique par une autre préparation phosphatasique de graines, celles de Moutarde-blanche.

De même, le suc d'Orange est dépourvu d'activité phosphodiéstérasique (AXELROD (8)).

Jusqu'ici, à notre connaissance, il n'a pas été décelé de phosphodiéstérase chez les Végétaux supérieurs.

Par contre, il existe des phosphodiéstérases dans divers organes de Mammifères.

Elles demeurent assez peu étudiées, PLUMEL (140-141) a pu déceler une activité phosphodiéstérasique relativement importante dans le sérum de Porc. De pH 6,0 à 8,0 le diester est même hydrolysé plus rapidement que le monoester. Les macérations de prostate humaine et le sperme qui renferment une phosphomonoestérase très active en milieu acide ne présentent qu'une activité très faible sur le diphénylphosphate et il semble y exister trois phosphodiéstérases isodynames.

FLEURY, COURTOIS et PLUMEL (82) ont étudié l'action de divers effecteurs sur les phosphomonoestérases et phosphodiéstérases du sérum de Porc. L'action de ces effecteurs indique de nombreuses similitudes de comportement entre les deux enzymes. Toutefois la phosphodiéstérase de pH optimum 4,5 se différencie plus nettement de la phosphomonoestérase associée que les enzymes actifs en milieu neutre ou alcalin.

Les diesters sont, en général, de mauvais substrats et le fait qu'ils ne soient pas hydrolysés par certaines préparations renfermant des monoestérases n'est pas une preuve absolument probante de l'existence de diestérases spécifiques.

UZAWA (167) signala, en 1932, qu'un venin de serpent hydrolyse le diphénylphosphate en libérant uniquement du phénol, le monophénylphosphate formé n'est pas déphosphorylé. Divers auteurs ne purent reproduire cette expérience, mais GULLAND et JACKSON (92) ont confirmé ces faits.

Etudiant une série de venins, ils trouvèrent dans quatre espèces de Vipéridés un venin agissant sur les diesters et inactif sur les monoesters.

V - ACTION SUR UN TRIESTER -

Chimiquement, les triesters sont les plus instables des trois classes d'esters orthophosphoriques ; les alcalis les saponifient rapidement en diesters. Les diesters sont relativement stables à l'action des alcalis et les monoesters pratiquement indécomposables. Les phosphatases agissent d'une façon exactement inverse de celle de ce réactif chimique : elles hydrolysent aisément les monoesters, assez difficilement les diesters et semblent sans action sur les triesters (takadiastase avec le triméthylphosphate et le triphénylphosphate - (NEUBERG et JACOBSON (27)), triamylphosphate - (FALKENHAUSEN(70))).

Nous avons fait des essais avec le triphénylphosphate : cet ester, purifié par recristallisations dans le chloroforme, est presque insoluble dans l'eau ; nous l'avons dissous dans l'acétone. Nous avons tout d'abord recherché si l'addition de la même quantité d'acétone inactivait la phosphatase.

10 cm³ de β -glycérophosphate M/4 amené à pH 5,6 par addition d'acide citrique sont mis en contact avec 5 cm³ de suspension d'enzyme à 1 % et de l'eau Q.S. pour 50 cm³.

En une heure trente à 37°, 14 milligr. de P₂ O₅ sont libérés. En remplaçant dans le milieu réactionnel 10 cm³ d'eau par 10 cm³ d'acétone, 9 milligr. de P₂ O₅ sont libérés dans les mêmes conditions. L'acétone réduit donc de 36 % l'activité phosphatasique.

10 cm³ de solution acétonique M/5 de triphénylphosphate sont mis en contact avec 0 gr. 20 d'émulsine, 20 cm³ de tampon acide citrique-soude de pH 5,6 et de l'eau Q.S. pour 50 cm³. Après vingt-quatre heures de contact à 37° on n'obtient aucune libération d'orthophosphate.

Après quarante jours à 37°, nous n'avons eu aucune libération de phosphate dans le témoin sans émulsine et 5 millig. dans l'essai en présence d'émulsine, soit environ 3 % du substrat hydrolysé. Nous pouvons en conclure que le triphénylphosphate n'est pratiquement pas hydrolysé par l'émulsine d'Amande.

CONCLUSIONS -

L'émulsine hydrolyse aisément les monoesters étudiés et le nucléinate de sodium ; elle n'a pas libéré d'orthophosphates à partir de l'acide phytique elle est pratiquement sans action sur le diester et le triester étudiés.

Les courbes d'hydrolyse de divers monoesters et du nucléinate en fonction du pH présentent des allures sensiblement identiques, l'optimum se situant vers pH 5,4 - 5,8.

Il semble que les substrats hydrolysables soient dédoublés par le même enzyme.

----- oOo -----

Chapitre IV

AFFINITE DE LA PHOSPHATASE D'AMANDE POUR DIVERS SUBSTRATS

* * *

*

On désigne sous le terme d'affinité de symbole K_m l'inverse de la constante de MICHAELIS K_m . Cette dernière est la constante de dissociation de la combinaison enzyme-substrat.

$$K_m = \frac{(E) \cdot (S)}{(E.S.)}$$

(E.S.) représente la concentration de la combinaison enzyme-substrat qui est dans un rapport fixe avec le produit des concentrations (E) de l'enzyme et (S) du substrat (1).

Un raisonnement mathématique permet de démontrer que la constante de MICHAELIS correspond en valeur absolue à la concentration du substrat permettant d'obtenir une vitesse de réaction égale à la moitié de la vitesse maxima. La vitesse maxima est la vitesse de transformation du substrat par l'enzyme saturé de ce substrat.

Pour mesurer la constante de MICHAELIS, on oppose à une dose constante d'enzyme, des quantités croissantes de substrat. On se place dans des conditions invariables de pH, température, concentration en tampon, etc... Si l'on porte en abscisses le logarithme négatif de la concentration moléculaire en substrat et en ordonnées la vitesse initiale de réaction, la courbe obtenue, d'allure sinuëuse, est analogue à la courbe de résidu de dissociation en fonction du pH d'un électrolyte faible.

(1) Nous ne développons pas le principe de la mesure de l'affinité. Cette question a fait l'objet d'un exposé très détaillé de COURTOIS dans sa thèse de Doctorat ès Sciences (32).

Cette courbe présente un point d'inflexion pour $S = K_m$ (la constante de MICHAELIS présente ainsi une analogie avec le pK d'un acide faible).

COURTOIS (32) a déterminé à pH 5,6 l'affinité de la phosphatase d'Amande pour les α et β -glycérophosphates $K_m = 51,5$ pour ces deux isomères.

COURTOIS et DENIS (50) ont utilisé les esters phosphoriques des alcools n-propylique et isopropylique. A pH 5,3 et 5,8 l'émulsine possède une plus faible affinité pour ces corps que pour les α et β -glycérophosphates.

Nous avons déterminé l'affinité de l'émulsine pour un certain nombre de substrats à pH 5,6. Nous ne donnons les chiffres expérimentaux que pour l'isobutylphosphate.

Le cahier abandonné à Rethel par M. COURTOIS contenait également les données expérimentales pour les autres corps, mais nous avons heureusement effectué les calculs et publié (54) les résultats.

Nous opposons à 0 gr. 05 d'émulsine des quantités variables de solution M/10 d'isobutylphosphate amenée à pH 5,6 par addition de tampon acide citrique-soude. Le volume réactionnel est amené à 50 cm³ par addition d'eau.

La durée de réaction à 37° est variable et a été calculée pour que l'hydrolyse du substrat n'excède pas 20 %. Nous pouvons ainsi déterminer la vitesse initiale de réaction, période où elle est à peu près directement proportionnelle au temps et où l'action inhibitrice des phosphates ne se manifeste pas.

TABEAU V - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT
SUR L'HYDROLYSE DE L'ISOBUTYLPHOSPHATE -

Centimètres cubes de solution M/10	pS (1)	Milligrammes de P2 O5 libérés ramenés à 24 heures d'hydrolyse
2	2,4	4
5	2,0	9,5
8	1,8	12,5
10	1,7	16,5
15	1,5	18
20	1,4	20,5
30	1,2	25
40	1,1	32,5

Les résultats nous ont permis de construire la courbe ci-jointe ; elle continue à monter et malgré la forte concentration en substrat, nous n'avons pas encore atteint la vitesse maxima.

En considérant la vitesse optima observée comme vitesse maxima (32 mg.,5 en vingt-quatre heures), l'affinité serait de 40 au maximum. Elle est, en réalité, bien inférieure et, en prolongeant la courbe d'après son allure générale, l'affinité se situerait vers 18.

Avec les autres substrats, nous avons trouvé à pH 5,6, 71 pour le méthylphosphate < 31 pour le glycolphosphate et < 20 pour les n-propyl, iso-propyl et n-butylphosphates.

(1) p.S. = - log. (S) - (S) concentration moléculaire en substrat.

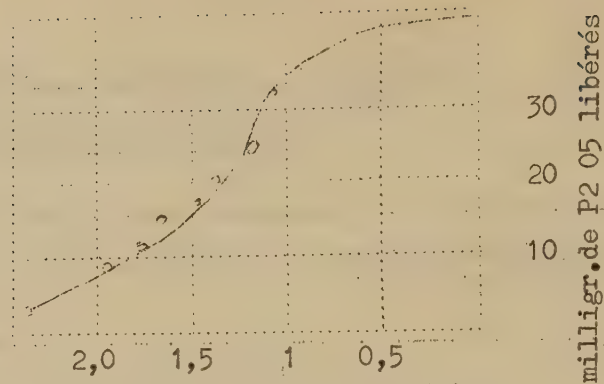


Fig. 5.- $p S, = - \log. (S)$
S, concentration moléculaire en substrat. Affinité de l'émulsine pour l'isobutylphosphate.

L'émulsine ne présente donc qu'une très faible affinité pour les esters d'alcools dérivant des carbures saturés ; l'affinité diminue avec la longueur de la chaîne puisque seul le méthylphosphate a permis de dresser une courbe caractéristique. Avec les alcools en C3 et C4 l'affinité est minime. Dans ce cas, la phosphatase d'Amande se différencie ainsi de la β -glucosidase d'Amande (VEIBEL (168)) ; avec cet enzyme l'affinité est plus faible pour le méthyl glucoside que pour les β propyl et β butyl-glucosides.

L'introduction d'hydroxyles sur la chaîne carbonée augmente l'affinité qui est beaucoup plus élevée pour les α et β glycérophosphates que pour les n-propyl et isopropylphosphates. C'est vraisemblablement à l'hydrophilie des fonctions alcool que l'on doit rapporter la plus grande stabilité de la combinaison enzyme-substrat.

Les affinités mesurées sont du même ordre de grandeur que celles d'autres phosphatases II.

Dans un tableau publié par COURTOIS (32) et reproduit par ALBERS dans son article sur les phosphatases (2), COURTOIS a calculé les affinités des diverses phosphatases d'après les données numériques de divers auteurs. Les phosphatases du type I présentent, en général, de très fortes affinités pour les esters phosphoriques, de l'ordre de 10.000 pour certains. Par contre, les phosphatases II représentent de bien plus faibles affinités pour le substrat de l'ordre de 100 en général. $K_m = 32$ pour la phosphatase prostatique, 34,5 pour celle du cerveau, 50 à 90 pour celles de la pomme de terre, 71 pour celle de la betterave.

Depuis la rédaction de ce tableau, quelques nouveaux résultats sont venus compléter ces données. L'affinité de diverses phosphatases II pour le

β glycérophosphate est de $K_m = 32$ à pH 5,8 avec la graine de Moutarde blanche, $K_m = 50$ à pH 5,3 et 40 à pH 5,8 pour la phosphatase de feuilles d'Amandier (COURTOIS et DENIS (50)).

BIGET (20) a trouvé 44,5 et 25 à pH 5,2 pour des échantillons distincts de phosphatase urinaire. Enfin ROCHE et NGUYEN VAN THOAI (150) ont trouvé, à pH 5,4 158 pour la phosphatase du Lactaire délicieux.

C O N C L U S I O N S -

Les phosphatases II présentent, en général, une faible affinité pour les substrats qu'elles hydrolysent. Nos résultats montrent que, dans le cas de la phosphatase d'Amande, l'affinité est plus élevée pour les glycérophosphates que pour les propylphosphates. D'autre part, elle est plus forte pour le méthylphosphate que pour les esters des alcools gras en C3 et C4.

----- oOo -----

Chapitre V

ACTION DE DIFFERENTS COMPOSES CHIMIQUES
SUR UN CERTAIN NOMBRE D'ESTERS PHOSPHORIQUES.

* * *

*

Les déterminations du pH optimum et de l'affinité de l'enzyme pour le substrat tendent à confirmer l'existence d'une seule mono-estérase hydrolysant les divers monoesters étudiés.

Nous avons cherché à préciser ces données en étudiant l'action de certains composés chimiques sur l'hydrolyse des monesters étudiés.

Comme composés chimiques, nous avons étudié les sels de magnésium, le fluorure de sodium et quelques oxydants ou réducteurs.

D'une façon générale, ces essais ont été conduits en faisant varier alternativement la concentration en la substance essayée et celle en substrat. Par contre, nous n'avons pas fait varier le pH du milieu.

Nous exprimerons nos résultats en activité relative de l'enzyme en présence du composé chimique. Lorsque l'enzyme réagit en l'absence de tout composé chimique, l'activité est fixée arbitrairement à 100 pour cette concentration en substrat, soit n_1 milligr. de P2 O5 libérés sous forme d'acide orthophosphorique dans cette réaction.

Un second essai est réalisé en présence du composé chimique, le pH, la durée de réaction, la concentration de l'enzyme ou du substrat étant identiques. Si n_2 milligr. de P2 O5 sont libérés, l'activité relative sera égale à $\frac{n_2}{n_1} \times 100$

Dans le tableau VI sont rangés les résultats obtenus avec une série

de substrats. 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % sont mis en contact pendant une heure trente à 37° avec une quantité variable de substrat amené à pH 5,6 et de l'eau distillée ou de la solution du corps expérimenté Q.S. pour 50 cm³.

TABLEAU VI - HYDROLYSE DE DIVERS SUBSTRATS PAR LA PHOSPHATASE -

Nature du substrat		Pyro- phosphate	Monomé- thyl- phosphate	n-propyl- phos- phate	n-butyl phos- phate	glycéro- phos- phate
Concentration	5	"	11 (1)	6,5	7	14
en substrat	10	20	16	9	14,5	17
en cm cubes	20	22	"	"	"	"
de solution M/6	30	"	18	14	17,5	19,5

Dans des expériences préliminaires, nous avons comparé l'hydrolyse de quelques substrats à trois concentrations différentes avec une dose constante de phosphatase. Le tableau VI indique les résultats de ces expériences.

Le β glycérophosphate est le substrat le plus rapidement hydrolysé ; les méthyl, n-butyl et n-propyl-phosphates viennent ensuite dans cet ordre, le pyrophosphate se classant en dernier lieu puisque par molécule de ce substrat hydrolysé, il y a libération de deux molécules de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ et non d'une seule comme pour les autres substrats. Selon l'affinité de l'enzyme pour le substrat, la vitesse d'hydrolyse croît plus ou moins nettement avec la concentration du substrat. Cet accroissement est beaucoup plus important avec les esters pour lesquels l'enzyme a une faible affinité n-propylphosphate, n-butylphosphate ; il est moins saillant avec les substrats pour lesquels l'affinité est plus élevée, le β glycérophosphate et surtout le pyrophosphate (FLEURY et COURTOIS (75)).

D'autres essais témoins ont été effectués dans des conditions un peu différentes.

(1) Les chiffres indiquent le nombre de milligr. de $\text{P}_2 \text{O}_5$ libérés.

Avec l'isobutylphosphate nous avons opposé 0 gr. 05 d'enzyme à des quantités variables d'isobutylphosphate M/8 amené à pH 5,6 et de l'eau Q.S. pour 50 cm³. Nous avons obtenu, après vingt-quatre heures, 4 milligr. de P₂ O₅ avec 5 cm³ de substrat, 6,5 pour 10 cm³ et 11 pour 35 cm³.

Avec l'ester de NEUBERG, nous avons fait réagir pendant vingt-quatre heures, à 37°, 0 gr. 01 d'émulsine, une quantité variable de substrat M/10 à pH 5,6 et de l'eau Q.S. pour 20 cm³.

Nous avons obtenu 1,16 milligr. de P₂ O₅ avec 1 cm³ de substrat, 4,5 milligr. avec 5 cm³ et 7,5 milligr. avec 15 cm³.

Avec l'hexosediphosphate (ester de HARDEN et YOUNG), nous opposons 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % à des quantités variables de substrat M/50 amené à pH 5,6 et de l'eau distillée Q.S. pour 50 cm³. Après réaction de vingt-quatre heures, à 37°, 5,5 milligr. de P₂ O₅ sont libérés à partir de 5 cm³ de substrat, 8 milligr. de 15 cm³ et 13 milligr. de 30 cm³.

Avec le nucléinate de sodium, nous opposons 5 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % à une quantité variable de substrat M/20 amené à pH 5,6 et de l'eau distillée Q.S. pour 50 cm³.

Après quarante-huit heures de contact à 37°, 4 milligr. de P₂ O₅ sont libérés à partir de 5 cm³ de substrat, 7 milligr. à partir de 15 cm³ et 16 milligr. à partir de 30 cm³.

A - ACTION DES SELS DE MAGNESIUM -

De nombreux travaux ont établi que l'ion (Mg)⁺⁺ exerce sur l'hydrolyse phosphatasique une action variant avec l'origine et le type de la phosphatase étudiée.

Les phosphomonoestérases du type I sont toutes activées par les sels de magnésium.

ERDTMANN découvrit, en 1927 (64), l'activation par le magnésium de la phosphatase rénale I.

Cette propriété fut étendue à un très grand nombre de phosphatases I, d'origines les plus diverses : os, foie, rein, sérum, glandes mammaires, lait, cerveau, salive, dents.

D'après BAMANN, RIEDEL et DIEDERICH (13), les enzymes directement solubles dans l'eau ou lyoenzymes sont beaucoup plus fortement activables que les enzymes non extractibles par l'eau du tissu normal, enzymes qui ne sont solubilisés que par autolyse du tissu : les desmoenzymes.

JENNER et KAY (105) ont établi qu'il existe une concentration optimum (en général de M/1.000 et M/500) en sels de magnésium provoquant l'activation, une concentration supérieure est inhibitrice.

Les sels de magnésium activent aussi, mais faiblement, les phosphatases du type IV ; ils inhibent nettement celles du type III, d'origine animale ou fungique. Par contre, ils activent la phosphatase III des feuilles (COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et KHORSAND (42, 43, 44)).

Les phosphatases du type II ne semblent pas activables par les sels de magnésium ; on observe même fréquemment une action inhibitrice.

Ces faits ont été observés sur les phosphatases II suivantes : rate (DAVIES, 60) ; rein (BAMANN - RIEDEL et DIEDERICH (13)) ; (BAMANN et DIEDERICH (11)) ; salive, graines de Soja, cerveau (GIRI (86 - 87)) ; sérum d'un sujet atteint de cancer prostatique et métastases osseuses (LUNDSTEEN et VERMEHREN (119)) ; phosphatases des graines de Moutarde blanche et Amande douce réagissant sur les α et β glycérophosphates (COURTOIS (32)) ; phosphatases des Basidiomycètes (NGUYEN VAN THOAI (130)).

COURTOIS (40) n'a pas décelé d'activation par les ions magnésium de la phosphatase de Moutarde blanche avec divers esters phosphoriques.

PEREZ (136) signale une légère activation de la phosphatase du Radis agissant sur le glycérophosphate.

COURTOIS et PEREZ (136) (56) ont signalé une légère activation par le sulfate de magnésium de la phosphatase II des graines de Seigle agissant sur le glycérophosphate. Pour des concentrations moléculaires variables de $\text{SO}_4 \text{ Mg}$ dans le milieu, les activités relatives à pH 5,2 sont respectivement : à une concentration $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en $\text{SO}_4 \text{ Mg}$ de 136 - $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: 149 et aux concentrations $2 \cdot 10^{-3}$ et $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de 117.

L'activation est donc très inférieure à celles observées avec les phosphatases alcalines I.

COURTOIS et PEREZ (56) (136) ont également observé une très légère activation inférieure à 10 p. 100 de la phosphatase des graines de Radis par l'ion magnésium.

Enfin FLEURY, COURTOIS et PLUMEL (82) signalent qu'à pH 4,5 la phosphatase II du sérum réagissant sur l'acide monophénylphosphorique n'est pas activée par l'ion Mg^{++} ; par contre à pH 4,5, il active la phosphodiesterase du sérum qui hydrolyse partiellement l'acide diphénylphosphorique en phénol et acide monophénylphosphorique.

Enfin COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et KHORSAND (52) (44) (108) ont signalé que les sels de magnésium activaient nettement les phosphatases du type III des feuilles. Par contre, ils demeurent sans action ou inhibent faiblement les phosphatases associées du type II.

Par contre, les sels de magnésium activeraient l'hydrolyse du β glycérophosphate par la phosphatase II du muscle et ne modifieraient pas l'hydrolyse de l' α glycérophosphate (KNOEVENAGEL (111)).

ROCHE et NGUYEN VAN THOAI (151) ont montré que dans le cas de la phosphatase II du Lactaire délicieux, l'action des sels de magnésium est la résultante de deux réactions influant en sens contraire sur l'hydrolyse du substrat :

1°/- En premier lieu, l'ion $(Mg)^{++}$ exerce une action protectrice sur l'enzyme en diminuant l'action inhibitrice des phosphates. L'ion $(Mg)^{++}$ empêche l'action inhibitrice des phosphates d'autant plus énergiquement que sa concentration dans le milieu est plus forte et cela indépendamment de son action inhibitrice propre vis-à-vis de la phosphomonoesterase de pH optimum 5,4.

L'ion (Mg) protège également la phosphatase II d'un autre Basidiomycète (Sléroderma) contre l'action inhibitrice des arsénates qui est du même ordre que celle des phosphates.

2°/- Les sels de magnésium à pH 5,4 réduisent fortement l'affinité de la phosphatase du Lactaire délicieux pour le β glycérophosphate. Cette affinité qui est $K_m = 158$ pour la préparation brute descend à 126 pour une concentration M/100 en sel de magnésium et 80 pour une concentration M/10.

La résultante de ces deux actions opposées se traduit par une faible action inhibitrice des sels de magnésium.

Nous avons étudié l'action du sel de magnésium à différentes concentrations du substrat, nous recherchions si ce sel modifiait l'affinité de la phosphatase d'Amande.

TABLEAU VII - ACTION DES SELS DE MAGNESIUM SUR LA PHOSPHATASE -

Nature du substrat	Pyro-phosphate	Méthyl-phosphate	n-propyl-phosphate	n-butyl-phosphate
Concentration du 5	"	100	100	93
substat en cm ³ 10	100	94	100	75
de solution M/6 20	104	"	"	"
30	"	116	93	74

Protocole opératoire identique à celui du tableau VI, mais en présence d'une concentration M/100 en Cl₂ Mg ; les chiffres représentent les activités relatives, rapport entre les quantités de P₂ O₅ libérées dans l'expérience en présence de composé chimique à celles libérées dans l'expérience témoin à la même concentration du même substrat, ce rapport étant multiplié par 100 (l'activité relative du témoin correspondant du tableau VII est donc 100.)

Avec 1,5 et 15 cm³ d'ester de NEUBERG M/10 et une concentration M/200 en chlorure de magnésium, les activités relatives ont été respectivement de 100, 100 et 115.

Avec 5, 15 et 30 cm³ d'hexosediphosphate M/50 et une concentration 0,006 M en chlorure de magnésium, les activités relatives sont 90, 112 et 100.

Enfin, avec 5, 15 et 30 cm³ de nucléinate de sodium M/20 et une concentration 0,06 M en chlorure de magnésium, nous obtenons respectivement comme activités relatives 100, 90 et 94.

Tous ces essais nous montrent que l'ion (Mg)⁺⁺ n'exerce aucune acti-

vation sur l'hydrolyse de divers substrats par l'émulsine d'Amande utilisée dans ces essais.

Les résultats sont, aux erreurs d'expérience près, presque identiques à ceux des témoins. On note cependant une légère tendance à l'inhibition, elle est particulièrement nette avec le n-butylphosphate. D'ailleurs, nous verrons par la suite que ce substrat est le plus sensible à l'action des inhibiteurs. Dans le cas du n-butylphosphate l'inhibition augmente avec la concentration du substrat, ce qui semblerait indiquer une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour ce dernier ; nous reviendrons plus loin sur ces faits.

Ce cas reste isolé car, avec tous les autres esters, l'influence des sels de magnésium ne paraît pas dépendre de la concentration du substrat. Dans la IIIe partie, nous avons étudié à nouveau cette action du magnésium sur des préparations de phosphatase d'Amande débarrassée d'acide phytique.

B - ACTION DU FLUORURE DE SODIUM -

Le fluorure de sodium n'exerce qu'une inhibition faible ou demeure sans action sur les phosphatases du type I, il inhibe faiblement celles du type IV (ROCHE et BULLINGER (147)). Par contre, les phosphatases du type III sont fortement inhibées ; il en est de même pour les phosphatases II de diverses origines.

a)- Animale -

Enzymes hépatique et rénal plus sensibles que les phosphatases osseuse et sérique (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI (17)) ; phosphatases du cerveau (CEDRANGOLO (31)), de la prostate et des produits d'éjaculation (KUTSCHER et WORNER (114)), de l'urine (DMOCHOWSKI (62), BIGET (20)), du sérum d'un malade atteint de cancer de la prostate (LUNDSTEEN et VERMEHREN (119)), du muscle de divers animaux (KNOEVENAGEL (111)), sérum de porc (FLEURY, COURTOIS et PLUMEL (82)).

b)- Végétale -

Phosphatases du Riz (MUNEMURA (125)), du soja (GIRI (87)), de la

Pomme de terre (PFANKUCH (138)), des feuilles (PRATESI (143)), des graines de Moutarde blanche et Amande douce (COURTOIS (35-36)) et, enfin de certaines bactéries (PETT et WYNNE (137)).

Le fluorure inhibe faiblement la phosphatase I, du Lactaire délicieux (Basisiomycètes) (NGUYEN VAN THOAI (130)).

PFANKUCH (138) a signalé que l'inhibition par une dose constante de fluorure sur une dose également constante de phosphatase de Pomme de terre augmentait avec la concentration du substrat. COURTOIS (35-36) a retrouvé le même fait avec les phosphatases de Moutarde blanche et Amande douce réagissant sur des α et β glycérophosphates.

Une étude plus détaillée de cette inhibition a permis d'en préciser le mécanisme : le fluorure augmente l'affinité KM de l'enzyme pour le substrat ; par contre, il réduit la vitesse de décomposition du substrat par les groupes actifs de l'enzyme. Il en résulte que, si l'on oppose à des doses constantes d'enzyme et de fluorure des quantités croissantes de substrat, l'on observe les faits suivants : aux très faibles concentrations en substrat, où le rôle de l'affinité est prépondérant, le fluorure entraîne une légère accélération de l'hydrolyse du substrat.

Par contre, ce rôle de l'affinité diminue progressivement lorsque croît la concentration en substrat ; dans ces conditions l'inhibition est de plus en plus marquée.

Le comportement des phosphatases animales II apparaît être exactement inverse. KUTSCHER et WUST (115) ont observé que l'inhibition d'une dose constante de phosphatase prostatique par une dose également constante de fluorure diminue progressivement lorsque la concentration du substrat s'élève. L'inhibition est inversement proportionnelle à la concentration du substrat, ce qui caractérise l'inhibition concurrente. Le fluorure agit comme s'il se fixait sur l'enzyme ; il entre ainsi en compétition avec le substrat qui, lui aussi, tend à se fixer sur l'enzyme.

Les deux combinaisons sont associables et la loi d'action de masse règle l'équilibre. Une forte dose de substrat favorise le déplacement du fluorure et diminue l'inhibition.

BIGET (20) a constaté que l'inhibition de divers échantillons de phosphatase urinaire était également inversement proportionnelle à la concentration du substrat.

Nous avons ainsi étudié l'action du fluorure de sodium sur diverses concentrations des esters étudiés.

Dans une première série d'essais, nous avons obtenu les résultats groupés dans le tableau VIII.

Les chiffres indiquent les activités relatives. Le protocole opératoire est identique à celui du tableau VI.

Avec l'isobutylphosphate et une concentration M/5.000 en FNa, les activités relatives pour 5, 10 et 35 cm³ de solution M/8 sont respectivement de 75, 77 et 63.

En étudiant l'ester de NEUBERG, une concentration M/2.000 en FNa fournit, avec 1,5 et 10 cm³ de solution M/10, des activités relatives de 100, 100 et 102.

TABEAU VIII - ACTION DU FLUORURE DE SODIUM SUR LA PHOSPHATASE D'AMANDE -

Nature du substrat		Pyro-phosphate		Méthyl-phosphate		n-propyl-phosphate	
Concentration en FNa		M/5000	M/500	M/5000	M/500	M/5000	M/500
Centimètres	5	"	"	86	36	53	38
cubes de	10	80	35	68	12	61	33
substrat	20	118	68	"	"	"	"
M/6	30	"	"	69	11	53	28
Nature du substrat		n-butylphosphate		β-glycérophosphate			
Concentration en FNa.		M/5000	M/500	M/5000	M/500		
Centimètres	5	100	Infime	93	25		
cubes de	10	75	Infime	82	29		
substrat	20	"	"	"	"		
M/6	30	74	Infime	82	30		

L'hexosediphosphate M/50 et une concentration M/500 en FNa fournit pour 5, 15 et 30 cm³ de substrat des activités relatives de 81, 93 et 73.

Enfin, nous avons utilisé le nucléinate de sodium M/20 avec 5, 15 et 30 cm³ de substrat ; le fluorure M/1.600 abaisse les activités relatives à 100, 90 et 94, le fluorure M/500 à 63, 66 et 25.

Ces essais nous montrent que le fluorure de sodium a inhibé l'hydrolyse de tous les substrats. Un seul fait exception : l'ester de NEUBERG que le fluorure M/2.000 ne semble pas inhiber.

Pour tous les autres substrats étudiés à une concentration M/5000, l'inhibition est faible mais nette ; à une concentration M/500 elle devient importante, elle est même presque totale pour le n-butylphosphate qui s'était déjà révélé être le substrat le plus sensible à l'action faiblement inhibitrice des sels de magnésium.

Avec tous les esters phosphoriques, l'action inhibitrice est d'autant plus manifeste que la concentration en substrat est plus forte. Cette forme d'inhibition est analogue à celle observée par COURTOIS avec les α et β glycérophosphates et cette phosphatase d'Amande. Il est donc presque certain que le fluorure agit sur les divers esters comme sur les β glycérophosphates : augmentation de l'affinité pour le substrat qui masque l'inhibition aux faibles concentrations en substrat et, parallèlement, action inhibitrice absolue en diminuant la vitesse de décomposition du substrat par les groupes actifs de l'enzyme.

Il paraît donc logique de considérer que le même enzyme hydrolyse tous les monoesters et le nucléinate de sodium. En tous cas cette inhibition proportionnelle à la concentration en substrat différencie nettement la phosphatase d'Amande des phosphatases II de la prostate ou de l'urine. KUTSCHER et WUST (115), BIGET (20), ont, en effet, montré que l'action inhibitrice du fluorure sur ces enzymes était inversement proportionnelle à la concentration en substrat.

Le pyrophosphate se comporte différemment des monoesters ; il est insensible à l'action du fluorure M/5.000. Le fluorure M/500 l'inhibe, mais l'inhibition augmente avec la concentration du substrat. Ceci n'a rien de

surprenant, il semble maintenant bien établi que les pyrophosphatases sont des enzymes distincts des phosphomonoestérases.

D'ailleurs, dans le cas particulier de la phosphatase d'Amande, FLEURY et COURTOIS (75-76) ont montré que les deux enzymes étaient distincts ; ils ont pu préparer par inactivation sélective un échantillon enzymatique privé de pyrophosphatase mais conservant encore une nette et minime activité glycérophosphatasique.

RECHERCHES SUR LA NATURE DE L'INHIBITION FLUOREE -

Nous avons cherché à préciser, non plus le mécanisme d'action, mais la nature de cette action inhibitrice du fluorure. Un certain nombre d'enzymes sont inhibés par ces sels et les auteurs admettent que le fluorure peut agir en s'unissant à un métal.

Le fluorure peut agir comme réactif précipitant en insolubilisant un métal indispensable à l'activité enzymatique : le calcium par exemple. Il peut aussi former des complexes avec ces éléments métalliques du type, par exemple, de la méthémoglobine fluorée.

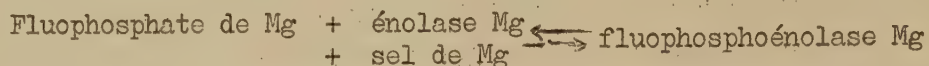
Nous avons cherché à réactiver la phosphatase par les sels de calcium et par deux métaux qui rentrent dans des co-enzymes connus : le fer constituant de la catalase et de ^{la} peroxydase et le cuivre constituant des oxydases (polyphénoloxydase, laccase).

Nous avons enfin utilisé l'acide ascorbique qui, par son caractère réducteur, était susceptible de réagir sur l'enzyme inactivé.

Lorsque nos recherches étaient terminées, nous avons eu connaissance des travaux de WARBURG et CHRISTIAN (170) : l'énolase qui déshydrate l'acide phosphoglycérique en acide phosphopyruvique (ester d'énol) est fortement inhibée par le fluorure.

WARBURG et CHRISTIAN ont obtenu l'énolase sous forme cristalline ; cette dernière est activée par les sels de Mg^{++} , Mn^{++} et Zn^{++} . L'activation magnésienne est la plus manifeste, le fluorure semble agir en bloquant le

magnésium. L'étude de la cinétique de l'énolase en présence de doses variables de fluorure et sel de magnésium tend à montrer que le fluorure dissimulé en fluophosphate de magnésium déplace le magnésium de l'énolase.



Les essais que nous avons effectués ne nous ont jamais permis de faire disparaître l'inhibition fluorée.

En premier lieu, le chlorure de calcium, pratiquement sans influence sur l'hydrolyse enzymatique, ne réactive pas la phosphatase ; tout au plus peut-on observer, dans le cas du méthylphosphate, une réactivation insignifiante.

TABLEAU IX - ESSAIS DE REACTIVATION DE L'ENZYME INHIBE PAR LE FLUORURE -

Concentration en FNa	0	M/500	0	M/500	0	M/500	0	M/500	M/500	M/100	0	M/500	M/500
	Cl2 Ca M/50	Cl2 Ca M/50	SO4 Cu M/5000	SO4 Cu M/5000	(NO3)3 Fe M/100	(NO3)3 Fe M/2500	(NO3)3 Fe M/100	(NO3)3 Fe M/250	(NO3)3 Fe M/2500	Acide ascorbique M/100	M/100	M/100	M/20
Centimètres	5	100	18	105	9	109	"	"	36	91	18	13	
cubes de	10	82	18	94	12	94	"	"	31	84	18	18	
méthylphosphate	30	105	27	105	16	111	"	"	33	105	33	14	
M/6						"	"	"	"	"	"	"	
Centimètres	5	92	30	92	28	84	7	30	"	"	"	46	
cubes de	10	89	28	105	32	94	11	28	"	"	"	50	
n-propyl-phosphate M/6	30	93	28	89	34	89	12	21	"	"	"	53	

N O T A - Les chiffres expriment les activités relatives calculées comme dans le tableau VII.

Protocole opératoire identique à celui du tableau VI

La phosphatase d'Amande inhibée par le fluorure n'est donc pas réactivée par addition d'un sel de calcium ; cette propriété lui est commune avec la takadiastase. INOUE (104) a signalé que l'inhibition de la phosphatase de la takadiastase par les sulfates ou les oxalates disparaît par addition de chlorure de calcium ; au contraire, l'inhibition par le fluorure n'est pas modifiée par ce sel de calcium.

Par contre, les phosphatases II du rein et du foie sont réactivées par le $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ (BELFANTI, CONTARDI, et ERCOLI (17)).

Le sulfate cuivrique M/5000 et le nitrate ferrique M/2500 sont pratiquement sans action sur la phosphatase d'Amande.

Dans un essai séparé avec le pyrophosphate, nous avons obtenu avec une concentration M/1.600 en $\text{SO}_4 \text{Cu}$ une libération de 15 milligrammes de $\text{P}_2 \text{O}_5$ avec 10 cm^3 de pyrophosphate M/6 à pH 5,6. Avec 20 cm^3 du même substrat 19 milligrammes étaient libérés.

Les essais témoins en l'absence de cuivre ont libéré respectivement 20 et 22 milligr. de $\text{P}_2 \text{O}_5$. Le sulfate cuivrique inhibe donc faiblement la pyrophosphatase.

Nous pouvons rapprocher la phosphatase d'Amande de celle du Soja (GIRI (87)) qui n'est que faiblement inhibée par le sulfate cuivrique ; la phosphatase de Pomme de terre est, par contre, nettement inhibée (PFANKUCH (138)).

A aucune concentration les sels ferriques ou cuivriques ne font disparaître l'inhibition fluorée ; il est donc probable que le fluorure n'agit pas en bloquant le cuivre ou le fer qui pourraient jouer un rôle dans l'activité de la phosphatase. Toutefois, nos résultats sont trop fragmentaires pour en tirer des conclusions aussi générales.

A une concentration M/100, le nitrate ferrique est un inhibiteur énergétique de la phosphatase d'Amande.

Enfin, l'acide ascorbique ne modifie pas l'action inhibitrice du fluorure.

Dans cette série d'essais les hydrolyses du méthylphosphate et du

n-propylphosphate sont influencées d'une semblable façon par les divers corps étudiés, ce qui est un nouvel argument en faveur de l'existence d'une seule monoestérase susceptible d'hydrolyser ces deux substrats.

Nous pouvons également remarquer que l'inhibition fluorée en présence des sels calcique, cuivrique, ferrique et d'acide ascorbique est, en général, inversement proportionnelle à la concentration du substrat comme si ces corps modifiaient le mécanisme de l'inhibition fluorée.

ESSAIS D'ELIMINATION DU FLUORURE PAR DIALYSE

INOUE (104) observa que la takadiastase inhibée par le fluorure n'était pas réactivable par dialyse.

Les phosphatases II hépatique et rénale sont, par contre, réactivées partiellement (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI (17)).

Cette réactivation est en raison inverse de la durée de contact avec le fluorure.

10 cm³ de suspension d'émulsine à 5 % sont additionnés de 0 gr,50 de fluorure de sodium et dialysés dans un dialyseur de Schülze sur parchemin contre de l'eau bi-distillée fréquemment renouvelée. La dialyse est poursuivie un certain temps à 0° ; le liquide non dialysé recueilli est amené à 10 cm³. 2 cm³ et 3 cm³ de cette préparation sont mis en contact vingt-quatre heures à 37° avec 10 cm³ de 3 glycérphosphate M/6 à pH 5,6 et de l'eau distillée Q.S. pour 50 cm³.

Durée de la dialyse	Centimètres cubes de préparation enzymatique	Milligrammes de P2 O5 libérés	
		Expérience témoin	Expérience avec FNa
24 heures	2	25,5	9
	3	38	12
12 jours	2	23,5	0,25
	3	25,5	0,75

Tableau X.
Essais de réactivation par dialyse après inhibition fluorée

Nous n'avons pu réactiver l'émulsine par dialyse. Le fluorure inactive peut-être l'enzyme en le détruisant car la préparation, qui conserve une partie de son activité après vingt-quatre heures lorsque le fluorure n'est pas totalement éliminé par dialyse, est presque totalement inactivée au bout de douze jours où le contact avec le fluorure à concentration continuellement décroissante a été de ce fait plus prolongé. Le fluorure semble donc agir soit en détruisant l'enzyme, soit, ce qui est plus douteux, en donnant une combinaison inactive très peu dissociable.

Nous avons d'ailleurs pu confirmer que le fluorure de sodium était sans action sur deux glucidases de l'émulsine : la β glucosidase et la β h-fructosidase (invertine).

Il peut exister une analogie entre l'inhibition fluorée de la phosphatase et l'inhibition par le cyanure des oxydases.

KUBOWITZ (112) prépara de l'oxydase purifiée de Pomme de terre ; cet enzyme est un cuproprotéide qui doit au cuivre son activité. L'action inhibitrice des cyanures sur les oxydases est un fait bien établi (FLEURY (72)).

KUBOWITZ observa que, dans l'oxydase inhibée par l'acide cyanhydrique, le cuivre se trouve engagé dans un complexe dialysable ; on peut ainsi priver de cuivre la protéine sans la dénaturer ; la protéine débarrassée de son cuivre est réactivable par les sels cuivriques exclusivement ; ceux d'autres métaux demeurent sans action. KUBOWITZ montra, en outre, qu'en présence de cyanure un autre cupro-protéide, l'hémocyanine, pigment respiratoire des mollusques, perd son cuivre par dialyse.

Les principaux résultats de ces recherches furent publiés en 1939 (COURTOIS et Melle MANOUVRIER (55)).

Par la suite, l'étude de l'action des fluorures sur diverses phosphatases fut l'objet d'un grand nombre de travaux. En règle générale, toutes les phosphatases acides sont inhibées par les fluorures (81-82-56).

COURTOIS et ANAGNOSTOPOULOS (43-5) ont étudié d'une façon détaillée l'inhibition fluorée ; ils réussirent à confirmer et préciser nos données expérimentales.

L'étude de la cinétique de la phosphatase de Moutarde en présence de

fluorure tend à montrer que l'effecteur forme avec l'enzyme une combinaison inactive fortement dissociable.

Les solutions saturées des fluorures de calcium, magnésium et zinc inhibent diverses phosphatases acides au même degré que des concentrations équivalentes de fluorure de sodium.

Par contre, la phosphatase alcaline du rein est activée par le fluorure de magnésium ; à la différence de la phosphatase d'Amande, la phosphatase de Moutarde, totalement inhibée par addition de fluorure, peut être réactivée soit par dialyse, soit par relargage au sulfate d'ammonium, soit par adsorption sur alumine, puis élution.

L'enzyme réactivé par dialyse conserve sa sensibilité initiale à l'inhibition fluorée.

Le fluorure n'intervient donc pas en précipitant un ion métallique indispensable à l'activité phosphatasique. Par ailleurs, la combinaison phosphatase-fluorure paraît être fragile et facilement dissociable.

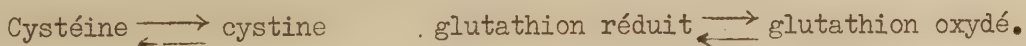
Enfin, récemment, ANIACNOSTOPOULOS (4) a étudié l'influence de formateurs de complexes comme le versène (acide tétracétique), sur la phosphatase II de la prostate.

Le versène peut faire disparaître l'inhibition fluorée. Il apparaît donc que les recherches ultérieures ont confirmé les essais rapportés dans ce chapitre.

Le fluorure ne semble pas inhiber les phosphatases acides en précipitant ou bloquant un ion métallique indispensable à l'activité de ces enzymes.

C - ACTION DES OXYDANTS -

WALDSCHMIDT-LEITZ (169) a montré que l'action hydrolysante ou synthétisante des enzymes était réglée par le potentiel d'oxydo-réduction du milieu; l'équilibre final serait ainsi sous la dépendance de certains systèmes oxydo-réducteurs comme les systèmes :



Un milieu réducteur augmenterait le pourcentage d'hydrolyse et un milieu oxydant favoriserait la biosynthèse.

En milieu glycérolé, l'action synthétisante de la phosphatase d'Amande n'est pas modifiée par addition de peroxyde d'hydrogène, l'acide ascorbique et l'hydrogène sulfuré inhibent, au contraire, la biosynthèse (COURTOIS (32)).

De nombreux auteurs ont étudié l'influence des substances oxydantes ou réductrices sur les phosphatases sans obtenir un ensemble de résultats cohérents.

La phosphatase II ne serait pas inhibée par les thiols qui inhibent, en général, les phosphatases I et IV (PFANKUCH (138), SCHAEFFNER et BAUER (155)).

KIESE et HASTINGS (109) ont réduit des 9/10 l'activité de la phosphatase par hydrogénation catalytique en présence de platine ou palladium. Un courant d'oxygène réactive l'enzyme réduit.

NGUYEN VAN THOAI (130) n'a pas observé d'action des cyanures, des sulfites, de la cystéine, de la cystine sur la phosphatase II du Lactaire délicieux.

Mme BESSE de LAROMIGUIERE (18) a étudié l'action d'un certain nombre de réducteurs et oxydants sur la phosphatase I intestinale purifiée. Parmi les réducteurs, l'acide ascorbique est un faible activateur ; le glutathion réduit et la cystéine n'inhibent que d'une façon minime, le cyanure de potassium a une action inhibitrice très nette.

Du côté des oxydants, le peroxyde d'hydrogène, le ferricyanure de potassium et le perborate de sodium se sont révélés sans action.

Nous avons étudié l'action de deux oxydants sur la phosphatase d'Amande le peroxyde d'hydrogène et l'iode.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié l'action de l'acide ascorbique et de ses produits d'oxydation sur la phosphatase d'Amande. Ceci nous a amenés à étudier l'action d'autres composés oxydants ou réducteurs sur la phosphatase.

Dans le tableau IX sont groupés les résultats de nos essais avec le peroxyde d'hydrogène et l'iode.

TABEAU XI - ACTION DE DIVERS OXYDANTS -

Nature du substrat		Glycéro-phosphate	Pyro-phosphate	Méthyl-phosphate	n-propyl-phosphate
Concentration en oxydant		O ₂ H ₂ à 1 volume	1 N/50	1 N/100	1 N/100
Centimètres cubes	5	50	"	41	38
de	10	50	12	25	33
substrat	20	"	10	"	"
M/6	30	54	"	27	25
<u>NOTA</u> - Les activités relatives sont calculées comme au tableau VII. Protocole opératoire comme au tableau VI.					

Le peroxyde d'hydrogène exerce une action inhibitrice sensiblement indépendante de la concentration du substrat ; nous avons dosé le peroxyde d'hydrogène par iodométrie et nous avons constaté qu'il en disparaissait environ 20 % au cours des une heure trente de la réaction.

L'iode exerce également une nette action inhibitrice ; elle s'observe à la fois sur les deux esters phosphoriques et sur le pyrophosphate. Comme nous avons utilisé une solution iodo-iodurée décinormale, nous avons recherché si l'action inhibitrice ne pouvait pas être attribuée à l'iodure de potassium. Nous avons fait des essais en présence de ce corps, nous avons également étudié l'action de l'iodure cuivrique.

A pH 5,6 nous avons vérifié que le mélange sulfate cuivrique-iodure de potassium ne libérait pas d'iode.

L'iodure de potassium seul ou en présence du sel cuivrique n'exerce donc aucune inhibition appréciable et c'est bien à l'iode métalloïde que l'on peut attribuer l'inhibition observée.

ACTION DES SELS DE MAGNESIUM, DU FLUORURE ET DE L'IODE SUR LES OXYDASES DE
L'ÉMULSINE -

Il nous a paru intéressant d'étudier l'action des deux principaux composés chimiques que nous avons mis en contact avec la phosphatase sur les oxydases associées dans l'émulsine.

ARTHUS et HUBER (7) ont montré que le fluorure n'inhibe pas les oxydases.

TABLEAU XII - ACTION DE L'IODURE DE POTASSIUM SEUL OU EN PRESENCE
DE SULFATE CUIVRICQUE SUR LA PHOSPHATASE D'AMANDE -

Nature du substrat	Méthylphosphate		n-propylphosphate	
Concentration en iodure de potassium	M/500	M/500	M/500	M/500
Concentration en sulfate cuivrique	0	M/500	0	M/1600
Centimètres cubes de substrat	108 (1)	92	100	100
M/6	92	88	105	100
	92	100	90	103
(1)- Activités relatives calculées comme au tableau VII, protocole opératoire du tableau VI.				

M. le Professeur HERISSEY nous a obligeamment indiqué qu'au cours de leurs recherches sur les hétérosides BOURQUELOT, HERISSEY et leurs élèves ont très fréquemment utilisé un milieu fluoré pour éviter le développement des moisissures au cours de l'expérience.

Nous avons étudié deux glucidases de l'émulsine : la β glucosidase et l'invertine (β h-fructosidase) qui est d'ailleurs peu active.

a)- β glucosidase. Nous l'avons fait réagir sur le salicoside.

20 cm³ de salicoside à 2,5 % amenés à pH 4,6 sont mis en contact avec 1 cm³ de suspension d'émulsine à 1 % et de l'eau ou une solution du composé chimique 5 cm³. Après une durée de réaction variable à 37° et défécation à l'acétate neutre de plomb, nous examinons le liquide au polarimètre.

La rotation initiale est de -2°12', après dix minutes de contact elle est descendue à -1°30' dans le témoin comme en présence de 5 cm³ de chlorure de magnésium M/10 ou 5 cm³ de fluorure de sodium M/100.

Après une heure nous trouvons -0°52' dans les trois mélanges ; par contre, en présence de 5 cm³ d'iode N/10, il n'y a pas eu d'hydrolyse et la rotation -2°12' est identique à la rotation initiale.

L'iode a donc inhibé totalement la β glucosidase ; le chlorure de magnésium et le fluorure de sodium n'ont exercé aucune action.

b)- Invertine -

20 cm³ de saccharose à 2,5 % amenés à pH 4,6 sont additionnés de 1 cm³ d'émulsine à 1 % et 5 cm³ d'eau distillée ou de solution de composé chimique.

La rotation initiale après défécation plombique est de + 2°2. Au bout de vingt-quatre heures, elle est de 1°34' dans le témoin ; 1°38' en présence de 5 cm³ de chlorure de magnésium M/10 ; 1°44' avec 5 cm³ de FNa M/100 et 1°40' avec 5 cm³ d'iode M/10.

Après quarante-huit heures à 37° nous avons dosé les sucres réducteurs par la technique de BERTRAND sur des prises d'essai identiques ; nous trouvons 22 milligr. de sucre interverti dans le témoin, 21,75 milligr. en présence de sel de magnésium et 23 milligr. en présence de fluorure.

Le fluorure de sodium et le chlorure de magnésium n'exercent donc aucune influence sur la β glucosidase et l'invertine de l'émulsine ; par contre, l'iode inhibe totalement la β glucosidase et semble sans action sur l'invertine.

COURTOIS (38) s'est basé sur ces résultats et a utilisé la différence d'action du fluorure sur les oxydases et les phosphatases. En milieu fluoré le saccharose-phosphate (hespéronal) est hydrolysé par les oxydases de l'invertine de levure et de la taka-diaстase ; cette hydrolyse ne s'accompagne pas de libération appréciable de phosphore minéral.

On peut ainsi, par la différence d'action inhibitrice, ne faire réagir que l'un des enzymes associés dans la préparation fermentaire.

----- oOo -----

DEUXIEME PARTIE

ACTION DES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

SUR LA PHOSPHATASE D'AMANDE

* * *

*

Chapitre premier

ACTION DE DIVERS OXYDANTS

* * *

I N T R O D U C T I O N -

Depuis la découverte de l'acide ascorbique par SZENT GYÖRGYI un très grand nombre de travaux ont eu pour objet l'étude de l'action de l'acide ascorbique en biochimie. Un certain nombre de ces recherches ont porté sur l'action de la vitamine C sur divers enzymes.

Les phosphatases, entre autres, ont été étudiées. EULER (65) PYLE (144) ont trouvé une inhibition des phosphatases I de l'intestin et du rein ; ALBERS a contesté ces faits et n'a pas observé d'action nette sur la phosphatase I rénale purifiée. Par contre, KING et DELORY (110) n'ont observé aucune action sur les phosphatases I du sérum et du rein. Il en est de même pour les phosphatases II de Pomme de Terre (PFANKUCH (138)) et du Soja (GIRI (87, 88)).

Par contre, la vitamine C active la phosphatase IV des hématies et inhibe l'enzyme III associé dans ces hématies (ROCHE NGUYEN VAN THOAI et Melle BAUDOIN (152)).

L'action des produits d'oxydation de l'acide ascorbique reste encore mal connue. L'acide déhydroascorbique paraît sans action sur l'activité de la phosphatase I du sérum (THANNHAUSER, REICHEL et GRATTAN (165), KING et DELORY (110)). GIRI a signalé le même fait pour la phosphatase II du Soja.

Les sels cuivriques inhibent les phosphatases du sérum (THANNHAUSER (165)) et de Pomme de Terre (PFANKUCH (108)) ; l'acide ascorbique ferait disparaître cette inhibition.

Par contre, on observe l'inverse avec la phosphatase du Soja (GIRI (88)). Cet enzyme n'est pratiquement pas inhibé par le sulfate de cuivre, mais se trouve l'être très fortement par les produits d'oxydation de l'acide ascorbique par le sulfate de cuivre.

Les composés sulfhydrilés qui protègent l'acide ascorbique de l'oxydation cuivrique réduisent ou font disparaître l'action inhibitrice sur la phosphatase de Soja. GIRI (89) constata que les extraits de rein renfermaient des substances protégeant l'acide ascorbique de l'oxydation.

L'acide ascorbique réduit le sulfate cuivrique ; en mélangeant ces deux substances on n'observe pas d'inhibition par les phosphatases I et II dans l'extrait rénal brut. Par contre, on observe une nette inhibition avec l'extrait dialysé ; les substances protégeant l'acide ascorbique de l'action de l'oxydant sont ainsi éliminées par dialyse.

L'extrait hépatique se comporte comme l'extrait rénal. Par contre, la phosphatase cérébrale, plus pure, est inhibée par le mélange sel cuivrique - acide ascorbique quel que soit son degré de pureté. Avec ces phosphatases également, la cystéine, les cyanures, les hydrosulfites protègent plus ou moins complètement l'enzyme de l'inhibition par le mélange sulfate cuivrique - acide ascorbique.

GIRI a, d'autre part, constaté qu'en oxydant l'acide ascorbique par le bleu de méthylène ou l'oxydase des concombres, il ne se formait pas de composés inhibiteurs ; par contre, l'oxydation de l'acide ascorbique par le ferrocyanure donne naissance à des composés inhibiteurs.

A la suite de ces diverses recherches, nous avons étudié l'action de l'acide ascorbique et de ses produits d'oxydation sur la phosphatase d'Amande.

Ces essais nous ont montré qu'une nette inhibition s'observait uniquement lorsque l'on oxyde l'acide ascorbique par les sels cuivriques ; nous avons fait de nombreux essais pour rechercher la cause de cette inhibition. Nous avons constaté qu'elle pouvait être rapportée pour la plus grande part au précipité cuivreux formé.

D'autre part, il se forme une substance inhibitrice soluble dont nous n'avons pu préciser la nature, mais dont l'action sur la phosphatase peut être rapportée à la présence du cuivre.

I - ACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE SES PRODUITS D'OXYDATION -

I - ACIDE ASCORBIQUE SEUL -

Dans notre étude de l'inhibition fluorée, nous avons vu que l'acide ascorbique M/100 était sans influence sur l'hydrolyse du méthylphosphate.

Nous avons effectué quelques essais avec d'autres substrats. Nos résultats sont groupés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII - ACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE SUR L'HYDROLYSE DE
DIVERS SUBSTRATS -

Nature du substrat	Pyro-phosphate		Méthyl-phosphate	n-propyl-phosphate		n-Butyl-phosphate	Glycéro-phosphate
	M/100	M/20	M/20	M/100	M/20	M/20	M/20
Concentration en acide ascorbique							
cm ³ de (5	"	"	86 (1)	61	92	85	70
substrat (10	90	110	75		105	55	88
M/6 (20	84	86	"		"	"	"
(30	"	"	89		85	60	113

(1) - Les chiffres indiquent les activités relatives calculées comme au tableau VII, technique d'essai du tableau VI

Nous pouvons constater que l'acide ascorbique ne provoque qu'une diminution d'activité peu importante ; en tout cas, il n'exerce aucune activation. Là encore, le n-butylphosphate est le plus sensible à l'inhibition.

Avec le β glycérophosphate et la phosphatase d'Amande amère, nous avons fait des constatations analogues. Avec le β glycérophosphate, l'activité à pH 5,2 est de 90 en présence de 2,5 cm³ d'acide ascorbique M/10.

L'inactivation biologique de la vitamine C par les alcalis est une notion classique. En mettant en contact 48 heures à la température ordinaire ces 2,5 cm³ d'acide M/10 avec 1 cm³ de bicarbonate de potassium normal, puis ramenant à pH 5,2 l'activité reste à 90 ; il ne s'est donc pas formé d'inhibiteurs de la phosphatase bien que la solution ait pris une teinte brun caramel.

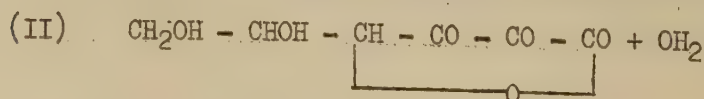
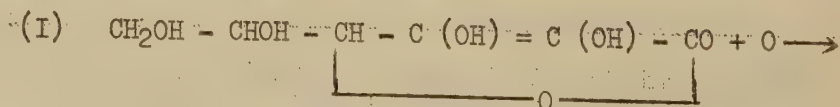
Dans tous les essais avec l'acide ascorbique, nous avons utilisé de l'eau bi-distillée pour éviter l'oxydation de l'acide par les traces de cuivre de l'eau distillée ordinaire, ces faibles traces pouvant provoquer la formation d'inhibiteurs de la phosphatase comme l'a signalé GIRI (88).

Dans toutes les recherches avec l'acide ascorbique nous avons ajouté au milieu la quantité d'alcali nécessaire pour que la solution ajoutée soit au même pH que le substrat utilisé pour l'essai. Inversement, lorsque nous avons ajouté un alcali au milieu, nous avons, dans ce cas, acidifié au pH du substrat. Nous spécifions une fois pour toutes ces conditions opératoires et nous ne reviendrons pas sur ce sujet. En résumé, dans chaque essai, nous avons ramené la solution au pH voulu : celui du tampon.

II - ACTION DES SELS CUIVRIQUES SUR L'ACIDE ASCORBIQUE -

L'action réductrice de l'acide ascorbique sur les sels cuivriques fut l'une des premières propriétés chimiques reconnues à ce corps.

KARRER et SALOMON (106) ont montré que l'acide ascorbique était oxydé par l'acétate cuivrique en acide déhydroascorbique selon la réaction.



En éliminant l'excès de sel cuivrique par la salicylaldoxime KARRER et SALOMON ont pu isoler à l'état amorphe l'acide déhydroascorbique formé et le réduire ensuite en acide ascorbique par un courant d'hydrogène sulfuré.

KARRER et SALOMON ont titré l'oxyde cuivreux précipité en utilisant le sulfate ferrique selon la technique de BERTRAND ; il reste en solution un peu de sel cuivreux car il se précipite un peu moins d'une molécule de OCu_2 par molécule d'acide ascorbique oxydé.

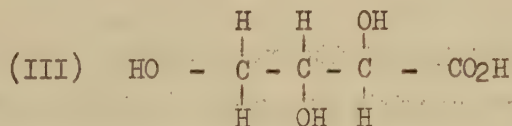
De très nombreuses recherches ont porté sur l'action des sels cuivriques sur la vitamine C, mais presque toujours les auteurs n'ont fait que doser chimiquement ou physiologiquement l'acide ascorbique disparu sans tenter de préciser quels étaient tous ses produits de transformation.

Dès 1921, HESS et UNGER ont signalé la destruction de l'acide ascorbique dans les aliments ; ensuite les données furent assez contradictoires mais, d'une façon générale, il se dégageait le fait que le cuivre favorisait cette destruction.

VON EULER, MYRBACK et LARSSON (69) ont montré que parmi tous les métaux, le cuivre était le catalyseur le plus actif de l'oxydation ascorbique.

En 1935, BARRON, DEMEIO et KLEMPERER (16) étudièrent dans l'appareil micromanométrique de WARBUG, la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de l'acide ascorbique.

En éliminant toute trace de cuivre du milieu, l'on observe aucune oxydation en dessous du pH 7,6. De pH 8,0 à pH 10,0 l'autooxydation apparaît alors ; une molécule d'oxygène se fixe sur une molécule d'acide ascorbique et il se forme de l'acide oxalique et de l'acide L-théorique ou acide trihydroxybutyrique (III).

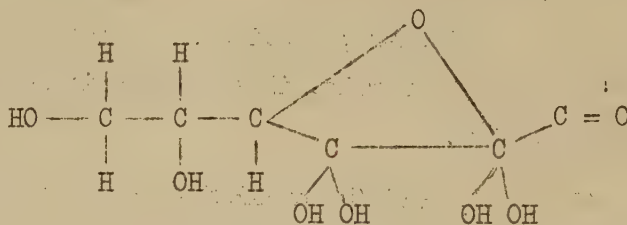


Il semble que l'acide déhydroascorbique, premier terme de l'oxydation de l'acide ascorbique par les sels cuivriques, soit ensuite transformé en autres produits d'oxydation.

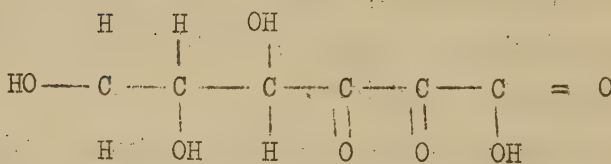
BORSOOK et DAVENPORT (28) ont étudié ces transformations. C'était un fait déjà établi que seule l'oxydation de la vitamine C en acide déhydroascorbique était physiologiquement réversible, BORSOOK et son collaborateur ont montré qu'à un pH plus alcalin que 4,0 l'acide déhydroascorbique était décomposé irréversiblement ; les corps formés ne sont plus réductibles par l'hydrogène sulfuré, il apparaît des composés acides plus dissociés que l'acide déhydroascorbique.

L'acide déhydroascorbique serait oxydé irréversiblement en acide 2,3 dicéto.L.gulonique (IV) qui, par élimination de l'hydroxyle du carbone 5 et ouverture du cycle lactonique, est oxydable par coupure de la chaîne carbonée en acides L-théorique et oxalique. On peut formuler ainsi ces réactions en écrivant la formule de l'acide déhydroascorbique sous forme de dihydrate.

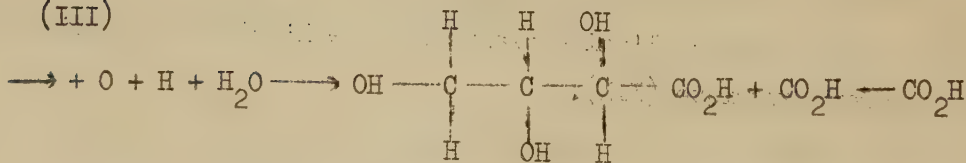
(II)



(IV)

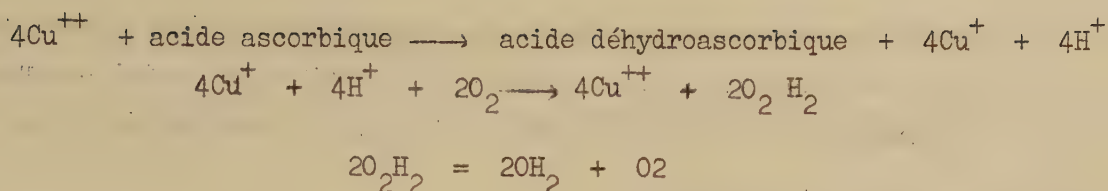


(III)



Une faible acidité ou un milieu alcalin favorisent donc cette transformation irréversible en acide dicétogulonique.

Selon ARMENTANO (6) l'oxydation catalytique de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique par des traces de cuivre s'accompagnerait de la formation transitoire de peroxyde d'hydrogène.



ARMENTANO a montré que de nombreux corps entravaient cette oxydation, tout d'abord les substances pouvant se combiner au cuivre et le bloquer : cyanure, sulfocyanure, l'oxyde de carbone qui agit par sa propriété de se combiner avec les sels cuivreux, les chlorures et pyrophosphates alcalins, les albumines. Le fluorure de sodium accélérerait, par contre, l'oxydation. L'influence des substances associées avait d'ailleurs préoccupé d'autres auteurs.

KELLIE et ZILVA (107) ont montré que les amino-acides ralentissaient l'oxydation en présence de cuivre. HOPKINS et MORGAN (102) ont décelé l'action protectrice du glutathion ; BEZSSONOFF et WOLOSZYN (19) celle de l'acide citrique, LYMAN, SCHULTZE et KING celle de l'acide métaphosphorique (120).

SALOMON (153) a étudié l'action inhibitrice des pyrophosphates sur l'oxydation.

Enfin, pour en terminer avec la destruction de l'acide ascorbique qui peut être rapportée au cuivre, PIEN et MEINRATH (139) ont montré qu'en atmosphère de gaz inerte N ou CO_2 la destruction de l'acide ascorbique à 100° à pH 3,2 ou pH 8,0 était infiniment plus faible qu'en présence d'oxygène.

Nous avons observé que, même en présence de tampon citrique qui protège l'acide ascorbique contre l'oxydation, l'activité de la phosphatase était fortement diminuée (Tableau XIV) par le mélange sel cuivrique + acide ascorbique.

Toutefois, l'hydrolyse du pyrophosphate qui protège l'acide ascorbique de l'oxydation cuivrique est beaucoup plus faiblement réduite que celle des autres corps. Nous avons observé avec le chlorure de magnésium et le fluorure de sodium que l'hydrolyse du butylphosphate est plus sensible à l'action des inhibiteurs que celle des autres substances ; nous retrouvons ici le même fait.

Nous avons cherché si d'autres substances oxydant l'acide ascorbique

IV - ACTION DU BLEU DE METHYLENE -

GIRI n'a pas trouvé d'action inhibitrice à l'acide ascorbique oxydé par le bleu de méthylène.

Les résultats de nos essais sont également groupés dans le tableau XV. Il n'y a pas pratiquement d'inhibition de la phosphatase d'Amande douce sur l'hydrolyse des méthyl et n-propylphosphates.

Deux ans plus tard, nous avons voulu préparer de l'acide déhydroascorbique par action du bleu de méthylène sur l'acide ascorbique.

TABLEAU XV - ACTION DU NITRATE FERRIQUE ET DU BLEU DE METHYLENE SEULS
OU EN PRESENCE D'ACIDE ASCORBIQUE SUR LA PHOSPHATASE -

Nature du substrat	Méthylphosphate				n-propylphosphate			
	0	M/20	0	M/20	0	M/100	M/20	M/20
Concentration en acide ascorbique								
	0	M/20	0	M/20	0	M/100	M/20	M/20
Concentration en bleu de méthylène	M/1000	M/1000	0	0	M/1000	M/1000	M/1000	0
Concentration en nitrate ferrique	0	0	M/2500	M/2500	0	0	0	M/2500
Centimètres cubes de substrat M/6	100 ⁽¹⁾	95	109	68	92	76	92	69
		81	94	90	100	94	89	72
	100	"	111	50	93	100	100	89

(1) Les chiffres indiquent les activités relatives calculées comme au tableau VII, protocole opératoire du tableau VI.

Dans ces recherches nous avons employé comme substrat le β glycéro-phosphate, comme enzyme la phosphatase d'Amande amère et un autre échantillon de bleu de méthylène officinal. Au cours de ces essais l'oxydation de l'acide ascorbique s'est accompagnée de la formation de substances inhibitrices de la phosphatase.

0 gr. 70 d'acide ascorbique sont dissous dans 20 cm³ d'eau distillée, nous acidifions par 0,5 cm³ d'acide acétique et ajoutons 10 fois à une demi-heure d'intervalle, 2 cm³ de solution saturée à 20° de bleu de méthylène.

Le flacon étant laissé dans un lieu très éclairé pour faciliter la réduction du bleu de méthylène (MENTZER (124)) la solution est alors amenée à 50 cm³.

5 cm³ inhibent la phosphatase d'Amande amère (Ac. 68) ⁽¹⁾. La solution est donc faiblement inhibitrice.

Il est admis que le bleu de méthylène oxyde l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique en même temps qu'il se trouve réduit en leuco-dérivé. Cette réaction est d'ailleurs couramment utilisée pour doser l'acide ascorbique dans les liquides biologiques (MENTZER (124)).

STRAUB, collaborateur de SZENT-GYORGYI (162) a étudié l'oxydo-réduction entre l'acide ascorbique et le bleu de méthylène ; il a pu montrer que deux réactions distinctes pouvaient évoluer parallèlement : l'oxydo-réduction directe et une seconde catalysée par le cuivre.

Les sels cuivriques accélèrent nettement l'oxydation de la vitamine C par le bleu de méthylène. Il existe une proportion linéaire entre la vitesse d'oxydation et la concentration en cuivre. La réaction normale non catalysée par le cuivre est beaucoup plus fortement accélérée par les radiations lumineuses que celle qui est catalysée.

Nous avons pensé que notre second échantillon de bleu de méthylène renfermait peut-être des traces de cuivre et que l'inhibition de la phosphatase

(1) Par abréviation Ac nous exprimons l'activité enzymatique relative en présence de la substance étudiée ; celle du témoin dans les mêmes conditions étant fixée arbitrairement à 100.

tase était provoquée par la présence de cuivre.

Dans les recherches que nous exposerons plus loin, nous avons constaté que l'hyposulfite de sodium faisait disparaître l'action inhibitrice de la solution obtenue en réduisant l'acétate cuivrique par l'acide ascorbique, l'oxyde cuivreux formé ayant été éliminé par filtration après une heure de contact des réactifs.

En ajoutant à 5 cm³ de la solution précédente d'acide ascorbique oxydé par le bleu de méthylène 20 cm³ d'hyposulfite de sodium N/10, la phosphatase n'est pratiquement plus inhibée (Activité 94).

La salicylaldoxime, qui précipite, fait disparaître d'une façon presque totale l'action inhibitrice de la solution obtenue avec l'acide ascorbique et l'acétate cuivrique. Il en a été de même avec la solution inhibitrice obtenue avec le bleu de méthylène : 20 cm³ de la solution précédente où nous avons oxydé l'acide ascorbique par le bleu de méthylène sont mélangés à 10 cm³ de solution alcoolique de salicylaldoxime au 1/100 ; après vingt-quatre heures de repos, filtration, l'excès de salicylaldoxime est enlevé par épuisement à l'éther. La solution est alors amenée à 100 cm³ ; 25 cm³ correspondant à 5 cm³ de la solution primitive abaissent l'activité à 80 tandis qu'avant traitement par la salicylaldoxime l'activité était de 68.

Ces deux essais permettent de supposer que c'est à des traces de cuivre que l'on peut rapporter l'action inhibitrice de l'acide ascorbique oxydé par le bleu de méthylène.

V - ACTION DE L'IODE -

Il est bien connu que l'action de cet oxydant est en relation avec le pH du milieu.

SZENT-GYORGYI (163), HERBERT, HIRST, PERCIVAL, REYNOLDS et SMITH (98) SHINOHARA (158) ont montré qu'en milieu d'acide la vitamine C réduit deux atomes d'iode et s'oxyde en acide déhydroascorbique. Pour un pH supérieur à 4,0, ce dernier évolue en acide dicétogulonique oxydé et coupé en milieu alcalin par deux autres atomes d'iode en acides thréonique et oxalique.

Nous avons effectué une série d'essais à différents pH. Nous désigne-

rons par C la solution d'acide ascorbique M/10 ; I, la solution d'iode N/10; l'activité (Ac) de la phosphatase d'Amande amère a été appréciée sur le β glycérophosphate selon le protocole habituel.

A - Milieu neutre -

1°/-	C 1,25 cm ³	I 5 cm ³	Ac 102
2°/-	C 2,5 cm ³	I 5 cm ³	Ac 100

Il n'y a pas de substances inhibitrices formées. Nous avons cherché si cette solution alcalinisée donnait naissance à des produits de transformation inhibiteurs.

5 cm³ d'I sont décolorés en milieu acide par 2,5 cm³ de C ; si l'on met en contact 48 heures à la température ordinaire avec 1 cm³ de CO₃KN N l'activité reste de 100.

Une solution préparée identiquement et mise en contact avec 5 cm³ de solution normale de soude ne donne pas naissance à des substances inhibitrices. Nous laissons 30 minutes en contact avec la soude ; après ce délai, nous obtenons Ac. 96 ; après 48 heures, Ac. 104.

Ces essais nous montrent donc que ni l'acide déhydroascorbique, ni ses produits de transformation en milieu alcalin ne sont des inhibiteurs de la phosphatase.

Nous devons signaler que dans certains essais, nous avons observé une inhibition totale de l'hydrolyse du β glycérophosphate mais nous n'avons pu les reproduire régulièrement. L'enzyme mis en contact avec l'inhibiteur n'est que très faiblement réactivé par dialyse ; par contre, un courant de SH₂ le réactivait presque totalement. Nous supposons que ces résultats aberrants pouvaient être provoqués par la présence de traces de cuivre dans le milieu.

Avec la phosphatase d'Amande-douce, nous avons obtenu des résultats analogues ; nous avons effectué deux essais en faisant varier le mode d'introduction des réactifs ou l'acidité du milieu. Comme nous avons coutume de le faire avec cette préparation fermentaire, nous avons déterminé l'activité

avec trois concentrations distinctes en β glycérophosphate. Toutes les mesures d'activité enzymatique étaient effectuées à pH 5,6. Nos résultats sont classés dans le tableau XVI.

Voici le détail du protocole des diverses expériences :

a)- Essai à pH 5,0 -

Au tampon acétique de pH 5,0, nous ajoutons 5 cm³ d'acide ascorbique M/10, puis 10 cm³ d'I N/10, la solution est ensuite amenée à pH 5,6 et additionnée de substrat.

b)- Essai à pH 7,0 -

On opère de même, mais en présence de tampon à pH 7,0. La solution ramenée à ce pH est laissée 24 heures en repos puis acidifiée à pH 5,6 et additionnée de substrat.

c)- Essai à pH 5,6 -

1°/- Le substrat est additionné d'acide ascorbique M/10, puis de 10cm³ d'iode N/10. La phosphatase est ajoutée aussitôt.

2°/- Essai identique, mais la phosphatase n'est ajoutée qu'après 2 minutes.

3°/- Les mêmes quantités d'iode et acide ascorbique sont mises en contact une heure avec le substrat à 37°. La phosphatase est ajoutée à ce moment.

4°/- 5 cm³ d'acide ascorbique M/10 sont mis en contact avec le substrat après une heure à 37°, nous ajoutons la phosphatase puis aussitôt après 10 cm³ d'iode N/10.

TABEAU XVI - ACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE OXYDE PAR L'IODE A
DIVERS pH SUR LA PHOSPHATASE D'AMANDE DOUCE -

Centimètres cubes de substrat M/6	Milligrammes de $P_{25}O_5$ libérés	Activités dans les expériences					
		A	B	C ¹	C ²	C ³	C ⁴
5	13,25	102 ⁽¹⁾	106	84	73	89	100
10	17,75	104	100	80	68	95	102
30	24,5	100	90	60	80	90	92
(1) Protocole opératoire du tableau VI. Les chiffres expriment les activités relatives comme au tableau VII.							

Dans ces essais nous n'avons jamais observé d'inhibition notable; cependant, dans l'essai C¹ à pH 5,6 se manifeste une inhibition dont nous n'avons pu interpréter l'origine.

Nous avons fait un seul essai avec un autre substrat, le méthylphosphate.

10 cm³ d'iode N/10 sont mélangés au méthylphosphate M/4 à pH 5,6 nous ajoutons ensuite l'acide ascorbique (5 cm³ de solution M/10), puis la phosphatase d'Amande douce ; avec 5, 10, 30 cm³ de substrat, les activités relatives sont respectivement de 90, 80 et 100.

B - Milieu alcalin -

Nous mettons en contact 4 atomes d'iode pour une molécule d'acide ascorbique. En effet, une molécule d'acide ascorbique réduit en milieu alcalin 4 atomes d'iode.

1°/- C 2 cm³ 5 + I 10 cm³ + 2 cm³ CO₃ KH N + 2 cm³ 4 CO₃ Na₂ N

Après deux heures de contact à la température ordinaire, tout l'iode n'est pas réduit, la solution est acidifiée à pH 5,2 et l'excès d'iode décoloré par une solution d'acide ascorbique Ac. 96. Après 48 heures de contact au lieu de deux heures, Ac. 102.

2°/- C 2 cm³ 5 + I 10 cm³ + 5 cm³ NaOH N après trente minutes de contact Ac. 113.

Ainsi les produits d'oxydation d'une molécule d'acide ascorbique par 4 atomes d'iode ne sont pas inhibiteurs.

L'action inhibitrice de l'acide ascorbique oxydé par le cuivre ne paraît donc pas pouvoir être rapportée aux composés connus de l'oxydation de l'acide ascorbique.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons également étudié l'action de l'acide ascorbique oxydé par le permanganate sur la phosphatase.

VI - ACTION DU PERMANGANATE DE POTASSIUM -

HERBERT et ses collaborateurs (98) ont montré que le permanganate de potassium en milieu acide oxydait l'acide ascorbique ; cette oxydation va jusqu'au stade acides thréonique et oxalique, ce dernier étant par la suite oxydé en CO₂ et OH₂.

HERBERT et ses collaborateurs (98) ont pu isoler l'acide thréonique formé par distillation du dérivé triméthoxylé.

Nous avons suivi une protocole d'oxydation calqué sur celui des auteurs anglais. La solution est additionnée alternativement et en plusieurs fois de 12,5 cm³ de SO₄H₂ à 20 % en volume et de 215 cm³ de MnO₄K 0,9 N jusqu'à ce que ce dernier ne soit plus décoloré. La solution est alors neutralisée à la phthaléine par une solution de potasse, il se forme un précipité volumineux d'hydrate manganeux éliminé par filtration rapide sur BUCHNER pour limiter la réoxydation du manganèse. Après avoir longuement essoré et lavé le gâteau d'hydrate qui brunit à l'air, le filtrat est neutralisé à l'acide sulfurique et concentré à 50 cm³ au bain-marie. Après une nuit de repos, il s'est formé

un abondant dépôt de cristaux de sulfate de potassium que l'on élimine par filtration. Le filtrat est essayé sur la phosphatase d'Amande amère ; avec 3 cm³ Activité 108 ; avec 5 cm³, Ac. 112.

Non seulement il ne se forme pas de substances inhibitrices, mais encore on observe une légère activation. Divers auteurs ont signalé une action activante des sels manganoux sur les phosphatases.

En particulier, ROCHE, NGUYEN VAN THOAI et Melle BAUDOUIN (152), ont observé que les ions Mn activent la phosphatase des hématies à pH optimum voisin de 5,5 et inhibent l'enzyme "très acide" assez voisin de ceux du type III. D'autre part, COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et KHORSAND (42) (43) (44) ont signalé que les sels manganoux activaient les phosphatases III de feuilles.

Nous avons pensé que la faible activation observée pouvait être rapportée à la présence des sels de manganèse non éliminés dans le milieu. Il n'en est rien car 3 cm³ de sulfate manganoux à 4 % abaissent l'activité de la phosphatase d'Amande amère à 76 ; avec 5 cm³, l'activité est de 78. La phosphatase II d'Amande est donc légèrement inhibée par les sels manganoux comme l'enzyme du type II présent dans les feuilles (42)(43)(44).

Pour terminer, nous avons étudié l'action sur la phosphatase de l'un des termes ultimes de l'oxydation de la vitamine C : l'acide oxalique ⁽¹⁾.

Avec 5 cm³ d'oxalate d'ammonium M/10, avec 5, 10 et 30 cm³ de β glycérophosphate M/4 pH 5,6 en utilisant 0 gr. 05 de phosphatase d'Amande douce et un volume total de 50 cm³ les activités sont respectivement de 109, 108 et 104.

CONCLUSIONS DE CE CHAPITRE -

La seule inhibition régulière de la phosphatase obtenue à partir des

(1)- Dans d'autres essais avec la phosphatase d'Amande douce nous avons observé que le mélange de 5 cm³ d'acide ascorbique M/5 à 5 cm³ d'eau oxygénée officinale ne donnait pas naissance à des substances inhibitrices. Pour un volume total de 50 cm³, avec 10 cm³ de β glycérophosphate M/6 Ac. 85, avec 30 cm³ du même substrat Ac. 103.

produits d'oxydation de l'acide ascorbique s'observe avec le cuivre comme oxydant.

Après oxydation de l'acide ascorbique par les sels ferriques, il se développe une légère inhibition.

Par contre, en utilisant comme oxydants le bleu de méthylène, l'iode en milieu acide ou alcalin, le permanganate de potassium, il ne se forme pas d'inhibiteurs.

L'action inhibitrice ne peut être rapportée aux acides déhydroascorbique, dicétogulonique, oxalique ou thréonique, produits actuellement connus de l'oxydation de la vitamine C.

II - ETUDE DE L'INHIBITION DE LA PHOSPHATASE PAR L'ACTION DES SELS CUIVRIQUES SUR L'ACIDE ASCORBIQUE -

Nous avons tout d'abord effectué une série d'essais qui nous ont montré que l'action inhibitrice était due, pour une part, au précipité d'oxyde cuivreux formé, d'autre part, à des substances demeurant en solution.

INFLUENCE DU MODE D'ADDITION DES REACTIFS SUR L'INHIBITION -

Dans ces essais, nous avons utilisé une solution M/10 d'acide ascorbique que, pour simplifier, nous dénommerons A et une solution de sulfate cuivrique M/10 que nous désignerons par B. Ces solutions sont utilisées directement ou après dilution au 1/10, A/10, B/10. Tous ces essais sont réalisés avec l'émulsine d'Amande amère et le β glycérophosphate selon le protocole habituel.

1°/- B/10 2 cm³, substrat tamponné par l'acide citrique 20 cm³, NaOH N/100 4 cm³, puis enzyme à 1 % 5 cm³ ; ensuite A/10 1 cm³, Ac. 85.

2°/- Idem, mais 20 cm³ de substrat tamponné à l'acide acétique, Ac. 62.

L'acide citrique qui ralentit l'oxydation de l'acide ascorbique réduit l'inhibition.

- 3°/- Comme 2, mais avec double dose de A et de B, Ac. 30. L'inhibition augmente nettement avec la concentration des deux réactifs.
- 4°/- B/10 2 cm³, A/10 1 cm³, OH² 10 cm³. Après une heure, NaOH N/100 4 cm³ et, après une nouvelle heure de contact à la température ordinaire, addition du substrat tamponné par l'acide acétique et de l'enzyme, Ac. 74.
- 5°/- Comme 4, mais double dose de B et de A, Ac. 57.
- 6°/- B/10 2 cm³, A/10 1 cm³, substrat tamponné à l'acide acétique 10 cm³, NaOH N/100 4 cm³. Après une heure de contact, addition des 10 autres cm³ du substrat et de l'enzyme, Ac. 80.

D'une façon générale, l'inhibition augmente avec la concentration en cuivre et acide ascorbique ; le mode d'introduction des réactifs a une très grande influence sur le développement de l'action inhibitrice.

Si nous comparons respectivement les essais 2 et 4, d'une part, et 3 et 5 d'autre part, nous voyons que l'inhibition est bien plus forte en ajoutant en dernier lieu l'acide ascorbique ; l'oxyde cuivreux se précipite en présence de l'enzyme. L'inhibition est plus faible quand il est déjà précipité avant l'addition d'enzyme : essais 4, 5 et 6.

C'est au précipité formé que l'on doit rapporter la majeure partie de l'action inhibitrice.

Nous avons fait réagir l'acide ascorbique sur le sulfate de cuivre dans différentes conditions de dilution, l'acide sulfurique libéré du sulfate cuivrique est neutralisé en une seule fois ou progressivement. Nous avons d'abord fait quelques essais avec un net excès d'alcali.

- 7°/- B 2 cm³. Eau distillée 10 cm³. A 1 cm³ puis baryte N 4 cm³ ajoutée par fractions de 0,5 cm³ tous les quarts d'heure ; la solution amenée à 20 cm³ est laissée en repos vingt-quatre heures et filtrée.

Nous avons déterminé l'activité de la phosphatase en présence de 2 et 4 cm³ de la solution obtenue qui, de ce fait, correspondent aux concentrations en acide ascorbique et cuivre des essais antérieurs.

2 cm³ est la dose correspondant aux essais 1, 2, 4, 6 et 4 cm³ à 3 et 5. Activité 2 cm³, 90 ; 4 cm³, 100.

8°/- Essai identique au précédent, mais on ajoute au début 80 cm³ d'eau avant addition de A et on dilue finalement à 100. En opérant en milieu dilué, nous pensions que s'il se formait un inhibiteur colloïdal ou peu soluble, il avait plus de chances de demeurer dans la solution.

Les essais d'activité ont été réalisés avec les doses correspondant à celles des essais antérieurs, soit 10 et 20 cm³ : 10 cm³ Ac. 100 ; 20 cm³ Ac. 102.

9°/- Identique à 8, mais en ajoutant un large excès de baryte : 8 cm³ de baryte N.10 cm³, Ac. 100 ; 20 cm³, Ac. 95.

10°/- Identique à 7, mais en utilisant 4 cm³ de soude normale : 2 cm³, Ac. 94 ; 4 cm³, Ac. 100.

Nous avons continué en ajoutant de la baryte ou de la soude en quantité exactement nécessaire pour neutraliser l'acide sulfurique libéré par la précipitation de OCu₂.

11°/- Comme 7, mais avec de la baryte N/10 4 cm³ en fractions de 0,5 cm³ : 2 cm³, Ac. 90 ; 4 cm³, Ac. 93.

12°/- Comme 8, mais 4 cm³ baryte N/10 : 10 cm³, Ac. 90 ; 20 cm³, Ac. 90.

13°/- Comme 11, mais en substituant NaOH N/10 à la baryte, 2 cm³, Ac. 100 ; 4 cm³, Ac. 84.

14°/- Comme 7, mais en ajoutant la baryte N/10 : 4 cm³ en une seule fois. 2 cm³, Ac. 104 ; 4 cm³, Ac. 90.

En ajoutant brusquement l'alcali, il semble se former une moindre proportion d'inhibiteur soluble. En opérant en milieu fortement alcalin, il ne se forme pratiquement pas de substances inhibitrices solubles. Si nous effectuons la réduction du sel cuivrique en neutralisant peu à peu l'acide sulfurique libéré, il se forme une faible quantité de substances inhibitrices ; l'inhibition est beaucoup plus faible que dans les six premiers essais où nous n'avons pas éliminé le précipité cuivreux. C'est à ce dernier que l'on semble pouvoir rapporter la majeure partie de l'action inhibitrice, cette action étant la plus élevée lorsqu'il se forme en présence de l'enzyme.

Cependant il peut se former des substances inhibitrices solubles

comme nous avons pu le constater en augmentant parallèlement les concentrations en sulfate cuivrique et acide ascorbique.

15°/- B 4 cm³, eau 6 cm³, puis A 4 cm³ en une seule fois NaOH N/10 8 cm³, amené à 20 cm³ et filtré après une heure : 4 cm³, Ac. 105 ; 8 cm³, Ac. 91.

16°/- B 8 cm³, eau 6 cm³, puis A 4 cm³ et en une seule fois 1,6 cm³ de NaOH, amené à 20 cm³ et filtré après une heure : 4 cm³, Ac. 46 ; 8 cm³, Ac. 35.

En augmentant les doses d'acide ascorbique et cuivre, une nette action inhibitrice de la solution se manifeste brusquement, un peu comme s'il s'agissait de la peptisation d'un précipité. En doublant les doses de vitamine et cuivre (exp. 15 et 16) l'inhibition croît très brusquement.

Nous avons alors étudié l'influence du mode d'addition des réactifs sur la formation de la substance inhibitrice soluble en utilisant les concentrations qui nous avaient fourni une nette inhibition dans l'expérience 16.

17°/- B 8 cm³, A 4 cm³. Après vingt-quatre heures de contact à la température ordinaire, il s'est déposé un léger précipité cohérent d'oxyde cuivreux, puis nous ajoutons en agitant huit fois de suite à un quart d'heure d'intervalles 1 cm³ de soude N/5. Nous complétons à 20 cm³.

Nous laissons encore en contact une heure après la dernière addition de soude et filtrons : 2 cm³, Ac. 38 ; 4 cm³, Ac. 12.

18°/- L'essai est identique à l'essai 17, mais la solution B est diluée par 80 cm³ d'eau, avant l'addition d'acide ascorbique : 10 cm³, Ac. 38 ; 20 cm³ Ac. 12.

La précipitation en solution plus diluée n'a pas accru la proportion d'inhibiteur soluble puisque les 10 et 20 cm³ de l'essai 18 correspondant aux mêmes proportions de réactifs que les 2 et 4 cm³ de l'essai 17 exercent respectivement des inhibitions égales.

19°/- B 8 cm³, A 4 cm³, OH₂ 6 cm³, puis, en une seule fois, 1,6 cm³ de baryte N. Après une heure de contact, la solution est amenée à 20 cm³ et filtrée : 2 cm³, Ac. 55 ; 4 cm³, Ac. 34.

20°/- Identique à l'essai précédent, mais la baryte est ajoutée en quatre fois à

un quart d'heure d'intervalle : 2 cm³, Ac. 14 ; 4 cm³, Ac. 7.

21°/- Comme l'essai précédent, mais en solution diluée, la solution cuivrique étant additionnée de 80 cm³ d'eau et le volume final de 100 cm³ : 10 cm³, Ac. 20 ; 20 cm³, Ac. 5.

Comme dans le cas de la soude, la dilution ne modifie pas l'apparition de l'inhibiteur.

22°/- Dans cet essai, la neutralisation a été effectuée beaucoup plus lentement. 4 cm³ de la solution A et 8 cm³ de solution B sont dilués dans 80 cm³ d'eau. Après vingt-quatre heures de contact nous ajoutons deux fois 0,4 cm³ de baryte N à une heure d'intervalle, puis, après vingt-quatre heures de contact, nous ajoutons deux fois 0,4 cm³. Nous complétons à 100 cm³ et filtrons : 10 cm³, Ac. 30 . 20 cm³, Ac. 20.

Si nous examinons les résultats des essais 16 et 22, nous pouvons faire deux remarques :

En ajoutant progressivement l'alcali il se forme plus d'inhibiteur soluble qu'en ajoutant en une seule fois tout l'alcali : soude ou baryte. Lorsqu'on effectue en plusieurs fois cette addition on observe que la précipitation d'oxyde cuivreux se fait progressivement.

Dans tous ces essais, le pH du liquide après addition de 1,6 cm³ d'alcali normal était voisin de 5,0.

Si une neutralisation progressive favorise la formation d'inhibiteur soluble, une neutralisation échelonnée sur un intervalle trop long, comme dans l'essai 22, est moins favorable qu'une neutralisation effectuée en deux heures.

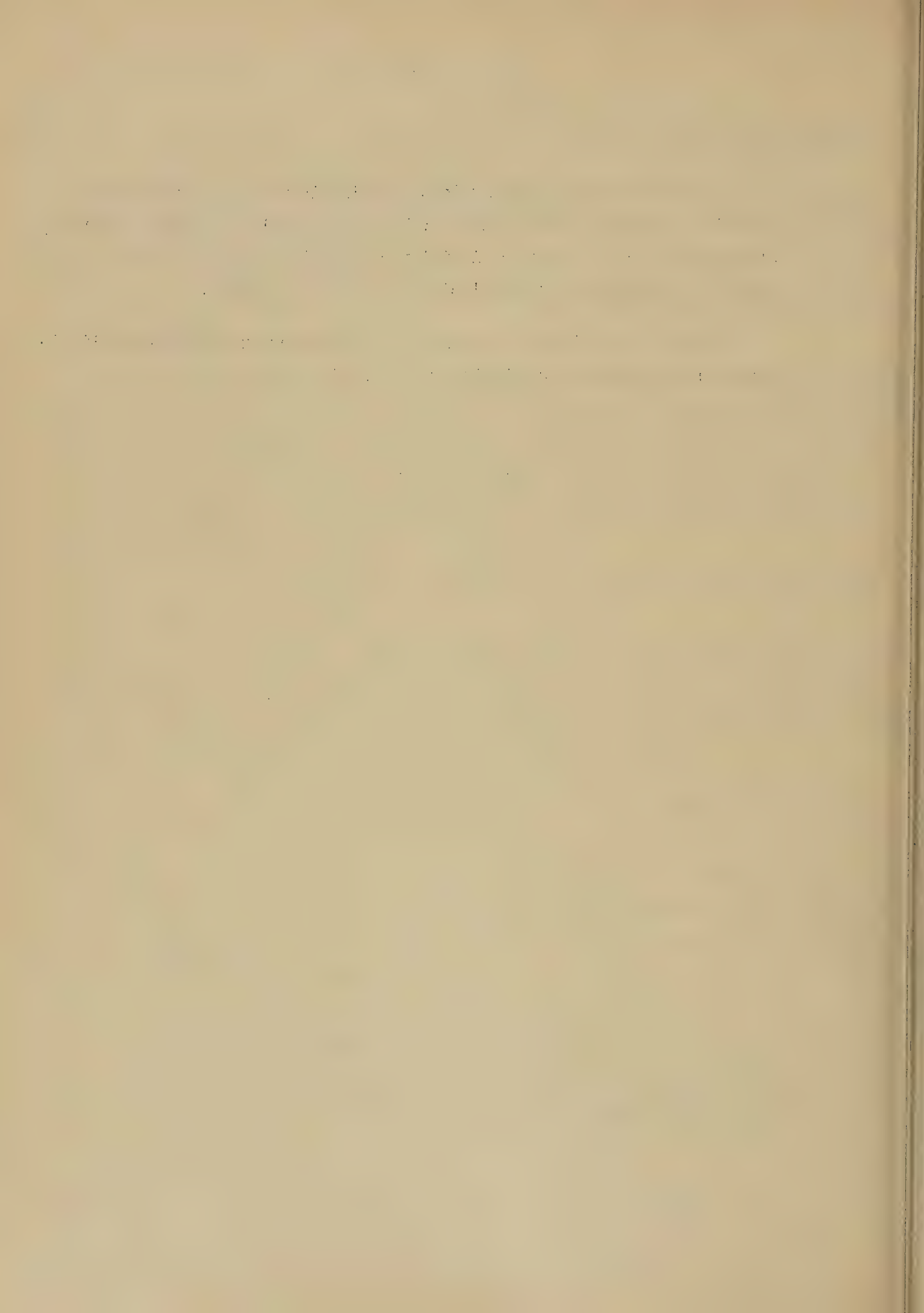
Si nous comparons respectivement les essais 17 et 20, 18 et 21 qui ne diffèrent que par l'emploi soit de soude N, soit de baryte N, nous pouvons constater que l'action inhibitrice de la solution est bien plus nette en neutralisant avec la baryte qu'en neutralisant avec la soude.

C O N C L U S I O N -

Ces essais nous montrent donc que l'inhibition de la phosphatase peut être rapportée à deux causes : la formation d'un précipité cuivreux, l'apparition d'une substance inhibitrice soluble qui ne se manifeste que pour des doses plus élevées d'acide ascorbique et cuivre.

Nous allons étudier séparément ces deux facteurs provoquant l'inhibition : le précipité insoluble et la solution.

----- oOo -----



Chapitre II

ACTION INHIBITRICE DU PRECIPITE CUIVREUX FORME.

* * *

*

Nous avons tout d'abord recherché si ce précipité ne renfermait pas de substances inhibitrices solubles en milieu neutre ou acide. Nous avons séparé les précipités formés en neutralisant progressivement le milieu réactionnel.

2 gr. d'acide ascorbique sont dissous dans 40 cm³ d'eau et additionnés de 100 cm³ de solution de sulfate de cuivre M/10 à 3 gr. 20 %.

Après une heure de contact, le précipité rouge jaunâtre formé est séparé par centrifugation ; nous obtenons un liquide surnageant I et un précipité. Ce dernier est lavé deux fois avec 5 cm³ d'eau distillée, suspendu à la machine à agiter pendant une heure dans 20 cm³ d'eau bouillie. Après une nouvelle centrifugation nous avons essayé le liquide surnageant sur la phosphatase d'Amande amère : 5 cm³, Ac. 100 ; 10 cm³, Ac. 100 ⁽¹⁾.

Le culot est alors suspendu dans 50 cm³ d'acide acétique au 1/10 en volume ; après 24 heures de contact et centrifugation le liquide est neutralisé : 5 cm³, Ac. 100 ; 7 cm³, Ac. 100.

Le liquide surnageant I obtenu au début est divisé en deux fractions: la première est neutralisée à la touche au rouge de méthyle ; après 24 heures de repos, elle est alors neutralisée au tournesol, il se dépose un précipité jaune d'or mélangé de cristaux bleus. Ce précipité est séparé après 24 heures. Le filtrat renferme des substances inhibitrices : 5 cm³, Ac. 11 ; 10 cm³, Ac. 8.

(1) Les déterminations d'activité phosphatasique sont réalisées en présence de tampon acétique. Nous avons en effet observé au chapitre précédent que l'acide citrique se combinant au cuivre restreignait l'inhibition. Toutes les mesures d'activité rapportées dans les Chapitres II et III de la 2ème partie sont faites en tamponnant le milieu par le système acide acétique-soude.

Le précipité est agité et mis à macérer dans 100 cm³ d'eau pendant 24 heures. Après filtration : 10 cm³, Ac. 97 ; 20 cm³, Ac. 86.

La seconde fraction du liquide surnageant I est susceptible de réduire l'acétate cuivrique et nous le neutralisons à la phtaléine; il se forme un précipité que l'on sépare après 24 heures.

Le filtrat renferme également des substances inhibitrices : 10 cm³, Ac. 26 ; 15 cm³, Ac. 23.

Le précipité est suspendu et mis à macérer dans 50 cm³ d'eau : 10 cm³, Ac. 102 ; 20 cm³, Ac. 102.

Nous avons complété ces essais en utilisant de l'oxyde cuivreux fraîchement préparé en réduisant la liqueur de Fehling par du glucose. 1 gr. d'oxyde est suspendu dans 50 cm³ d'acide acétique à 20 %. La suspension est portée une heure à 100° et laissée ensuite 24 heures à la température ordinaire; le filtrat est neutralisé, puis essayé sur la phosphatase : 3 cm³, Ac. 98 ; 5 cm³, Ac. 96.

Ainsi les précipités cuivreux obtenus au cours de la neutralisation progressive du mélange réactionnel acide ascorbique-sulfate cuivrique ne cèdent pratiquement pas de substances inhibitrices à l'eau ou à l'acide acétique dilué. L'oxyde cuivreux se comporte de même.

L'action inhibitrice ne peut pas être rapportée à la formation d'une substance peu soluble, en grand partie précipitée, le liquide surnageant étant en équilibre avec elle. Il paraît bien que nous ayons deux inhibiteurs distincts : l'un précipité, l'autre soluble.

Nous avons donc étudié l'action du précipité d'oxyde cuivreux sur la phosphatase : une solution à 1 % d'émulsine d'Amande amère est mise en contact avec 0 gr. 50 d'oxyde cuivreux, le mélange est agité fréquemment et filtré après 24 heures.

La majeure partie de la phosphatase est inactivée. 2 cm³ libèrent 0,5 milligr. de P₂O₅ tandis que la même préparation enzymatique n'ayant pas été en contact avec l'oxyde en libère 8 milligr.

3 cm³ de la préparation enzymatique ayant été en contact avec 0 Cu₂

glucidases et les phosphatases de la takadiastase ou de l'émulsine.

L'essentiel de nos résultats fut publié en 1943 (57-58) ; en 1946 MAPSON (123) réalisa un certain nombre d'essais similaires aux nôtres mais en utilisant comme enzyme l'uréase de la fève Jack (Canavalia ensiformis).

Ses conclusions sont analogues à celles que nous avons présentées antérieurement : l'acide ascorbique n'inhibe pas l'uréase en l'absence d'ion Cu^{++} le pyrophosphate qui le complexe ou le diéthyl-dithiocarbamate qui le précipite font disparaître l'inhibition. En effet, seules les préparations impures renfermant des traces de cuivre sont inhibées par l'acide ascorbique.

Enfin, les sels cuivreux inhibent l'uréase. L'uréase inactivée dans ces conditions récupère son activité lorsque l'on précipite le cuivre par l'hydrogène sulfuré.

I - ACTION DE L'OXYDE CUIVREUX SUR DIVERS ENZYMES DE LA TAKA-DIASTASE -

a) M A L T A S E -

0 gr. 50 d'oxyde cuivreux fraîchement préparé par action du glucose à chaud sur la liqueur de Fehling et lavé à plusieurs reprises par de l'eau distillée bouillie sont suspendus dans 20 cm³ de solution à 2 % de taka-diaastase en poudre PARKE-DAVIES. Après contact de 48 heures à la glacière, la solution est centrifugée ; son pH s'est élevé de 6,2 à 6,8.

1 cm³ du liquide surnageant est mélangé à 5 cm³ de maltose à 10 % et 5 cm³ de tampon acétique N à pH 5,2.

Un essai témoin est fait parallèlement en utilisant 1 cm³ de la même préparation enzymatique conservée à la glacière en l'absence d'oxyde cuivreux.

Après une durée de contact variable à 37°, la réaction est bloquée et la solution déféquée par addition de 1 cm³ de solution d'acétate neutre de plomb (réactif de COURTONNE), puis, aussitôt après, 1 cm³ de solution saturée de sulfate de sodium.

Après filtration, nous déterminons le pouvoir rotatoire de la solution sur un tube de 2 décimètres. Nous avons obtenu les chiffres suivants après 48 heures d'hydrolyse.

TABEAU XVII - ACTION DE LA MALTASE CONSERVEE OU NON EN PRESENCE
D'OXYDE CUIVREUX SUR LE MALTOSE -

	solution de maltose sans maltase	en présence de maltase brute	en présence de maltase mise en contact avec 0 Cu ₂
Rotation observée en degrés et minutes	+ 10°4'	+ 9°25'	+ 9°58'
Pourcentage d'hydrolyse d'après le pouvoir rotatoire.	0	54	38
Milligr. de cuivre réduits par 1 cm ³ de solution	40	48	44,5

Nous avons ainsi pu calculer le pourcentage d'hydrolyse du substrat. Nous avons, d'autre part, dosé par la technique de BERTRAND les sucres réducteurs dans la solution déféquée, le maltose et le glucose ayant des pouvoirs réducteurs différents et tous deux fonctions de la concentration en ose ; nous indiquons seulement les chiffres de cuivre réduit, le pourcentage d'hydrolyse ne pouvant être calculé.

La maltase a donc perdu une partie de son activité par contact avec l'oxyde cuivreux.

Le pH du milieu s'étant modifié au cours de la macération en présence d'oxyde cuivreux, nous avons pensé que cette inactivation pouvait être rapportée à une modification de la réaction du milieu. Nous avons fait un nouvel essai en milieu tamponné.

0 gr. 40 de taka-diaстase sont dissous dans 20 cm³ d'eau ; nous ajoutons 4 cm³ de tampon acétique N de pH 5,2 et laissons en contact comme précédemment avec de l'oxyde cuivreux. La mesure d'activité est réalisée en mélangeant 2 cm³ de l'enzyme, 5 cm³ de maltose à 10 %, 2 cm³ de tampon à pH 5,2 et 5 cm³ d'eau. La solution est déféquée comme précédemment et nous dosons les sucres réducteurs.

La macération avec OCu_2 a donc diminué d'environ 60 % l'activité de la maltase de la taka-diaastase.

TABLEAU XVIII - ACTION DE LA MALTASE SUR LE MALTOSE -

Durée d'hydrolyse	0	18 heures	42 heures
Milligrammes { maltase brute	76,5	91,0	110,0
de Cu { maltase traitée par OCu_2 .	76,5	83,0	90,0
réduits			

b)- β GLUCOSIDASE -

Nous avons utilisé une solution de taka-diaastase à 2 % ; une partie a été conservée à la glacière avec du tampon à pH 5,2 et une autre avec le tampon et OCu_2 .

5 cm³ de préparation enzymatique sont mis en contact avec 2 cm³ de tampon acétique pH 5,2 et 15 cm³ de salicoside à 2,5 %.

10 cm³ de solution sont déféqués par 1 cm³ de solution d'acétate neutre de plomb et 1 cm³ de solution de sulfate de sodium ; le filtrat est examiné au polarimètre $t = 21^\circ$, $l = 2$.

La taka-diaastase hydrolyse beaucoup plus lentement le salicoside que les émulsines d'Amandes (douce ou amère). Le séjour à la glacière en présence du tampon n'en modifie pas l'activité ; par contre, l'oxyde cuivreux a fait disparaître au moins 60 % de l'activité hydrolysante.

c)- SUCRASE -

Nous avons eu recours à l'enzyme de l'Aspergillus orizae.

TABLEAU XIX - ACTION DE LA TAKA-DIASTASE SUR LE SALICOSIDE -

Durée de la réaction ...	0		1 jour		3 jours	
	Rotation & en degrés minutes	Pourcentage d'hydrolyse	Rotation & en degrés minutes	Pourcentage d'hydrolyse	Rotation & en degrés minutes	Pourcentage d'hydrolyse
Taka-diaстase brute	- 2°0'	0	- 1°46'	15	- 0°96'	28
Taka-diaстase conservée avec tampon	- 2°0'	0	- 1°50'	13	- 0°60'	30
Taka-diaстase avec OCu_2 et le tampon	- 2°0'	0	- 1°90'	3	- 1°60'	11

Selon KUHN et WEIDENHAGEN, l'hydrolyse de ce corps doit être rapportée principalement à une α glucosidase identique à la maltase. L' α glucosidase de la taka-diaстase s'attaquerait à l' α glucose du saccharose.

L'invertine de levure, au contraire, agirait surtout par une fructo-
sidase attaquant le β fructofuranose du saccharose.

Nous avons suivi polarimétriquement l'action de 1 cm³ de solution à 2 % de taka-diaстase sur 10 cm³ de saccharose à 10 % et 2 cm³ de tampon à pH 5,2. L'enzyme conservé avec de l'oxyde cuivreux en milieu tamponné a hydrolysé 1 % du substrat en 3 heures et 4,5 % en 18 heures.

L'enzyme témoin conservé en milieu tamponné a hydrolysé dans les mêmes délais respectivement 6 et 25 % de substrat.

Le contact avec l'oxyde cuivreux a donc fait disparaître environ 80 % de l'activité de la sucrase.

d)- PHOSPHATASE -

La taka-diaстase mise en contact avec de l'oxyde cuivreux en l'absence du tampon devient totalement inactive sur le β glycérophosphate à pH 4,0.

Conservée en milieu tamponné à pH 5,2, elle possède encore 10 % de son activité initiale.

L'action inhibitrice est ainsi beaucoup plus marquée qu'avec les oxydases.

II - ACTION DE L'OXYDE CUIVREUX SUR LA β GLUCOSIDASE ET LA PHOSPHATASE D'AMANDE -

L'émulsine d'Amande amère est délayée au mortier dans de l'eau distillée, puis soumise à une agitation mécanique de 2 heures. 20 cm³ de suspension à 1 % filtrée sur papier sont maintenus 24 heures à la glacière avec 5 cm³ tampon de pH 5,2 et 0 gr,50 d'oxyde cuivreux. Le pH s'élève de 5,2 à 5,8 ; ne peut donc y avoir d'inactivation par cette modification de pH, car nous nous trouvons dans la zone où la phosphatase d'Amande présente son maximum de stabilité. (COURTOIS (36)).

a)- β GLUCOSIDASE -

2 cm³ de préparation enzymatique sont mis en contact avec 10 cm³ de salicoside à 2,5 % et 2 cm³ de tampon acétique pH 5,2.

L'hydrolyse est suivie au polarimètre après défécation au plomb.

L'enzyme témoin conservé à la glacière en présence de tampon seul hydrolyse 25 % du substrat en 3 heures 30 minutes à 37° ; l'enzyme traité par l'oxyde cuivreux n'en dédouble que 9 %. En 18 heures, à 20°, l'enzyme témoin hydrolyse 39 % du substrat, l'enzyme traité par l'oxyde cuivreux 12 % ; il a donc perdu environ les 2/3 de son activité.

b)- PHOSPHATASE -

En outre, nous avons déterminé l'activité phosphatasique de ces deux préparations sur le β glycérophosphate. Avec 5 cm³ de l'enzyme, la préparation qui a été en contact avec l'oxyde ne conserve que 43 % de l'activité de l'essai-témoin. En utilisant 7 cm³ d'enzyme l'activité est de 38 %.

Nous nous sommes demandé si la perte d'activité de ces enzymes par contact avec l'oxyde cuivreux était due à une inactivation chimique ou, au contraire, à une adsorption de l'enzyme sur le précipité. C'est un fait

assez général et maintes fois signalé que les enzymes fixés sur un adsorbant conservent leur activité ; ils sont devenus insolubles et on a créé de véritables desmoenzymes avec un support artificiel. A ce fait se superpose d'ailleurs l'éluion spécifique de l'enzyme adsorbé par le substrat. Il y a cependant des cas où l'enzyme adsorbé n'est plus actif.

L'oxyde cuivreux, qui avait été en contact avec l'émulsine, a été lavé avec 1 cm³ d'eau et suspendu dans 5 cm³ d'eau distillée.

3 cm³ de cette suspension mise en contact avec du β glycérophosphate dans les conditions habituelles, ont libéré en 48 heures à 37° moins de 0,5% du phosphore présent. Les 2 autres cm³ de suspension ont été mis en contact à 37° avec 10 cm³ de salicoside à 2,5 % amené à pH 5,2. Après 48 heures nous n'avons décelé aucune variation du pouvoir rotatoire. Il semble donc que l'oxyde cuivreux n'agit pas en adsorbant l'enzyme, mais en l'inactivant.

C O N C L U S I O N S -

Par contact avec l'oxyde cuivreux, la phosphatase d'Amande est fortement inactivée. Cette inactivation paraît provoquée par une destruction de l'enzyme ; il ne semble pas y avoir simple adsorption de l'enzyme.

L'action inactivante de l'oxyde cuivreux n'est pas spécifique de la phosphatase d'Amande ; nous avons pu observer avec toutes les autres hydrolases étudiées : β glucosidase d'Amande, phosphatase, maltase, sucrase, β glucosidase de l'*Aspergillus orizae*.

Le précipité d'oxyde cuivreux qui apparaît au cours de l'oxydation de l'acide ascorbique par les sels cuivriques intervient donc pour une grande part dans l'inhibition de la phosphatase.

Chapitre III

ETUDE DE LA FRACTION INHIBITRICE SOLUBLE

* * *

*

ACTION SUR LA SUCRASE ET LA β GLUCOSIDASE -

Nous avons tout d'abord recherché si cette fraction inhibait d'autres enzymes que la phosphatase.

0 gr. 90 d'acide ascorbique sont dissous dans 50 cm³ d'eau ; nous ajoutons 30 cm³ de solution saturée d'acétate cuivrique ; quelques secondes après le mélange apparaît une teinte rouge marron ; c'est vraisemblablement un complexe instable de cuivre et d'acide ascorbique comme SZENT-GYÖRGYI et BANGA (163) en ont préparé un avec les sels de fer. La teinte rouge disparaît rapidement et fait place à la teinte jaune d'or du précipité cuivreux ; après 24 heures de contact, le précipité est éliminé par filtration et le filtrat amené à 100 cm³. Nous avons déterminé l'action de ce filtrat sur l'hydrolyse des osides.

1°/- SUCRASE -

1 gr. 85 de saccharose sont dissous dans 11 cm³ d'eau, nous ajoutons 5 cm³ de tampon acétique pH 5,2, 5 cm³ du filtrat après oxydation de l'acide ascorbique et 2 cm³ de taka-diaстase à 2 %.

Les sucres réducteurs libérés ont été dosés par la technique de BERTRAND. Un témoin est préparé en substituant de l'eau distillée au produit d'oxydation cuivrique.

Des essais effectués au temps 0 permettent de déterminer par la technique de BERTRAND d'une part le pouvoir réducteur non négligeable de la taka-diaстase, d'autre part celui des produits d'oxydation de l'acide

ascorbique par le sulfate cuivrique.

Après correction des résultats, nous avons obtenu, après 10 heures, à 37°, une hydrolyse de 32,5 % dans l'essai témoin, contre 0,4 % avec l'acide ascorbique oxydé.

Après 42 heures à 37° les hydrolyses sont respectivement de 44 % et 2 %.

Si l'on compare à l'action inhibitrice sur la phosphatase dans les conditions habituelles, cet inhibiteur réduit à 24 l'activité au cours de l'hydrolyse du β glycérophosphate par la phosphatase d'Amande amère.

L'inhibition de la sucrase d'*Aspergillus* est bien plus accentuée, car elle atteint environ 95 %.

2°/- β GLUCOSIDASE -

Nous mélangeons 5 cm³ de salicoside à 2,5 % + 5 cm³ de tampon acétique pH 5,2, 5 cm³ d'émulsine d'Amande amère à 1 % et 6 cm³ d'eau distillée ou de produit d'oxydation de l'acide ascorbique.

Ce dernier fait dévier la lumière polarisée et est coloré en bleu ; nous avons dosé le glucose libéré par la technique de BERTRAND :

Durée d'hydrolyse à 37°	Pourcentage d'hydrolyse	
	Témoin	avec Cu + vitamine C
4 heures	91	0
18 heures	96	0

L'acide ascorbique oxydé par les sels cuivriques inhibe donc totalement l'hydrolyse du salicoside.

Ainsi l'inhibition des deux glucidases est beaucoup plus importante que celle de la phosphatase.

Il aurait ainsi paru préférable de poursuivre nos recherches sur la substance inhibitrice soluble en utilisant non point une phosphatase, mais l'une des deux glucidases. Nous avons préféré poursuivre nos essais avec la phosphatase pour deux raisons :

- 1°/- Il est plus facile de doser l'acide phosphorique libéré qu'un sucre libéré, car il est nécessaire de soustraire l'action réductrice propre de la solution inhibitrice.
- 2°/- D'une façon générale, les sucres ou leurs dérivés ont tendance à inhiber les glucidases ; l'acide ascorbique s'apparentant aux sucres, les produits d'oxydation sont susceptibles d'exercer une inhibition supplémentaire à celle de la substance inhibant la phosphatase.

ACTION DE QUELQUES REACTIFS CHIMIQUES SUR LA SOLUTION INHIBITRICE -

Cette solution renferme toujours du cuivre non réduit ; la réduction ne semble pas pouvoir être intégrale, car même avec un notable excès d'acide ascorbique, la solution conserverait la teinte bleue des ions $(Cu)^{++}$, cette solution réduisant l'acétate cuivrique ajouté.

A première vue, la réaction d'oxydo-réduction semble réversible avec un équilibre très fortement en faveur du système acide déhydroascorbique et $(Cu)^{++}$.

Nous avons retenu le fait signalé par KARRER et SALOMON (106) qui avaient remarqué qu'en dosant l'oxyde cuivreux formé, il restait toujours un peu de cuivre en solution.

Nous avons recherché si les réactifs qui précipitent le cuivre ou le dissimulent à l'état de complexes modifient l'action inhibitrice.

De nombreux auteurs ont montré que ces corps : cyanures, dérivés sulfurés, etc... protègent l'acide ascorbique contre l'oxydation cuivrique. GIRI (88-89) a d'ailleurs observé régulièrement qu'en leur présence, le mélange acide ascorbique-sulfate cuivrique ne donnait naissance qu'à une inhibition bien moindre ou minime de la phosphatase.

Nos essais sont différents ; nous ne cherchons pas à empêcher l'oxy-

dation réalisée, à faire disparaître l'inhibiteur.

Nous avons étudié successivement l'action d'un agent réducteur et précipitant : l'hydrogène sulfuré ; de deux agents précipitants assez spécifiques du cuivre : la salicylaldoxime et le réactif de DELEPINE (diéthylldithiocarbamate) ; d'un autre réactif précipitant moins spécifique : le ferrocyanure et de substances dissimulant le cuivre à l'état de complexes : cyanure, sulfocyanure, hyposulfite.

I - Action de l'hydrogène sulfuré -

0 gr.30 d'acide ascorbique dissous dans 40 cm³ d'eau sont mélangés à 10 cm³ de solution saturée d'acétate cuivrique ; après une heure de contact la solution est filtrée.

10 cm³ de solution font descendre à 24 l'activité de la phosphatase.

Après passage d'un courant d'hydrogène sulfuré, séparation du sulfure de cuivre par filtration, élimination de l'excès d'hydrogène sulfuré par barbotage d'un courant d'air sous pression réduite à la température ordinaire, 10 cm³ sont neutralisés à pH 5,4, Ac. 78 ; il y a donc eu une nette réactivation qui peut être imputée soit à la précipitation du cuivre, soit à l'action réductrice de l'hydrogène sulfuré.

Cette seconde alternative est la moins probable car nous avons vu que l'acide déhydroascorbique n'est pas inhibiteur et il paraît bien être le seul produit d'oxydation de l'acide ascorbique réductible par l'hydrogène sulfuré.

10 cm³ de la solution réactivée partiellement par SH₂ mis en contact 24 heures avec 5 cm³ de soude N, puis neutralisés, voient augmenter leur action inhibitrice. (AC. 55).

II - Action de la salicylaldoxime -

Nous faisons réagir les mêmes quantités de réactifs que dans l'essai précédent ; le filtrat est additionné de 0 gr. 25 de salicylaldoxime dissoute dans 10 cm³ d'alcool à 90°. Il se forme un abondant précipité séparé au bout de 24 heures.

Le filtrat est épuisé deux fois de suite par 25 cm³ d'éther pour enlever l'excès de salicylaldoxime. L'éther dissous et l'alcool sont éliminés en concentrant la solution sous vide dans un dessiccateur à acide sulfurique ; la solution concentrée est alors diluée à 50 cm³.

10 cm³ de cette solution sont mis en contact avec du β glycérophosphate et de la phosphatase d'Amande amère à pH 4,0 ; dans ces conditions, l'activité de l'enzyme est la même que dans l'essai témoin ; la salicylaldoxime a donc fait disparaître totalement l'action inhibitrice, vraisemblablement en précipitant le cuivre.

Comme après action de SH₂, la solution réactivée donne naissance à un inhibiteur par séjour en milieu alcalin : 10 cm³ de solution sont mis en contact avec 2 cm³ de soude N pendant 6 heures à 25° ; la solution devient progressivement jaune, puis marron. Après neutralisation, elle est inhibitrice (Ac. 64).

Nous avons, d'autre part, étudié l'extractum éthéré ; ce dernier est évaporé, puis repris par 20 cm³ d'eau. Avec 10 cm³ AC. 31.

Cette inhibition doit être rapportée non pas à l'extraction de l'inhibiteur par l'éther, mais à la salicylaldoxime.

1°/- 0 gr. 10 de salicylaldoxime amènent une baisse d'activité à 86.

2°/- Nous traitons par l'éther une préparation d'inhibiteur obtenue avec le sulfate cuivrique et non additionnée de salicylaldoxime. L'éther est séché sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporé à l'air, on n'observe pas de résidu sensible ; le cristalliseur est cependant lavé avec de l'eau distillée, il ne passe aucun inhibiteur en solution Ac. 102.

L'augmentation de l'inhibition par séjour en milieu alcalin pouvant être provoquée par des impuretés provenant de l'alcali, par exemple des traces de cuivre, nous avons tenu à recommencer l'expérience avec une autre solution de soude.

0 gr. 60 d'acide ascorbique sont dissous dans 50 cm³ d'eau ; nous ajoutons 10 cm³ de solution saturée d'acétate cuivrique, quantité suffisante pour oxyder tout l'acide ascorbique, nous complétons à 100 cm³ et filtrons après

24 heures. Le filtrat est nettement inhibiteur : 5 cm³, Ac. 35 ; 10 cm³, Ac. 25.

Le filtrat est additionné de 6 cm³ de solution d'acétate cuivrique, il apparaît un nouveau précipité éliminé par filtration au bout de 24 heures.

Nous traitons comme précédemment par la salicylaldoxime, puis l'éther, et concentrons à 50 cm³. A pH 5,4, 10 cm³ de solution abaissent à 90 l'activité.

10 cm³ sont mis en contact 12 heures avec 4 cm³ de soude N, puis neutralisés, Ac. 81.

Nous observons à nouveau qu'après réactivation partielle et action des alcalis l'inhibition augmente faiblement. Cette inhibition est peu marquée relativement aux concentrations de réactifs utilisés, elle est infiniment moins nette que celles provoquées par le sel cuivreux précipité ou la solution obtenue par oxydation cuivrique de l'acide ascorbique.

Nous n'avons pas poussé plus avant nos recherches, mais nous pouvons conclure qu'en alcalinisant le produit de la réaction sel cuivrique-acide ascorbique, il se forme une troisième substance inhibitrice, d'action moins marquée que le précipité ou la fraction soluble en milieu faiblement acide.

L'inhibition qui a disparu après précipitation du cuivre par la salicylaldoxime peut être retrouvée en introduisant du cuivre dans le milieu. Une préparation d'inhibiteur traitée comme précédemment par la salicylaldoxime puis l'éther est agitée à la machine avec de l'oxyde cuivreux ; après filtration, la solution qui, précédemment, abaissait l'activité de la phosphatase à 90, l'abaisse à 85. La solution a bleui et il s'est formé par oxydation de $O\ Cu_2$ un sel cuivrique. Nous ne pouvons donc dire si l'inhibition est due au sel cuivrique formé ou à l'action du sel cuivreux.

III- Action d'un dialcylthiosulfocarbamate -

20 cm³ d'une préparation d'inhibiteur dont 5 cm³, Ac. 32 sont additionnés de 5 cm³ de solution alcoolique de diéthylthiosulfocarbamate. Cette solution a été obtenue en mélangeant 0,25 cm³ de sulfure de carbone, 0,25 cm³ de diéthylamine ; le résidu est redissous dans 50 cm³ d'alcool à 90°.

Le précipité cuivrique demeure à l'état plus ou moins colloïdal, il est soluble dans les solvants organiques (DELEPINE (61)) ; nous l'extrayons par trois agitations avec 10 cm³ de chloroforme. Nous avons donc mélangé la solution d'inhibiteur au réactif de DELEPINE.

Une dose de solution correspondant à 5 cm³ de solution inhibitrice initiale abaisse l'activité à 40. Il n'y a donc eu qu'une réactivation minime en précipitant le cuivre, mais il n'a pas été éliminé totalement car l'extraction chloroformique n'a pas fait disparaître la teinte jaune du dérivé cuivrique.

IV - Action du ferrocyanure -

3 cm³ de ferrocyanure de potassium à 15 % n'inhibent pas la phosphatase Ac. 98.

4 cm³ d'une solution inhibitrice obtenue à partir du sulfate et qui abaissait l'activité à 13 sont mélangés à 3 cm³ de ferrocyanure. Un précipité apparaît aussitôt ; il semble être un mélange de ferrocyanure cuivreux et cuivrique, sa teinte est intermédiaire entre la teinte marron du ferrocyanure cuivrique et la teinte rouge du ferrocyanure cuivreux.

Après centrifugation, le liquide surnageant abaisse à 52 l'activité de la phosphatase ; il y a donc eu une très nette réactivation, mais elle n'est pas totale.

V - Action du cyanure de potassium -

Ce dernier n'exerce aucune action sur la phosphatase d'Amande. Avec 5 cm³ de solution M/20, Ac. 100 ; avec 10 cm³, Ac. 101. Cette dernière est donc insensible à l'action des cyanures qui inhibent de multiples enzymes des catégories les plus diverses.

Nous avons mélangé 4 cm³ d'inhibiteur obtenu avec le sulfate de cuivre, et abaissant l'activité à 13 avec diverses doses de cyanure, il se forme un précipité séparé après repos d'une heure par centrifugation ; ce précipité est soluble dans un excès de cyanure et se trouve presque totalement redissous avec 20 cm³ de CNK M/20. Avec cette dose de cyanure, la coloration bleue de l'inhibiteur a disparu.

Le cyanure fait en grande partie disparaître l'inhibition avec 1 cm³ de CNK M/20 Ac. 13, 10 cm³ Ac. 66, 20 cm³ Ac. 66 ; la réactivation exige une certaine quantité de cyanure, elle n'est pas totale, car elle est la même avec 10 et 20 cm³ de cyanure.

Le précipité formé par addition de cyanure à l'inhibiteur est probablement uniquement constitué de cyanure cuivreux ; il est insoluble dans l'acide chlorhydrique, soluble dans l'ammoniaque en donnant la teinte bleue de l'eau céleste, également soluble dans un excès de cyanure en donnant une solution incolore. Cette solution est inactive sur la lumière polarisée ; les produits d'oxydation de l'acide ascorbique étant pour la plupart actifs, la réactivation peut donc être rapportée à la précipitation ou au blocage sous forme de complexe des ions Cu^{++} et non à la précipitation du dérivé cuivreux ou cuivrique d'un produit d'oxydation de l'acide ascorbique.

VI - Action du sulfocyanure de potassium -

Ce corps exerce une faible mais nette activation de la phosphatase. Avec 20 cm³ de SCNK M/10, Ac. 123.

4 cm³ d'inhibiteur abaissant l'activité à 23 sont mis en contact avec 10 cm³ de sulfocyanure M/10. L'activité de la phosphatase remonte à 87 ; il y a donc une nette réactivation, mais elle n'est pas totale.

VII- Action de l'hyposulfite de sodium -

Ce corps active faiblement la phosphatase. Avec 20 cm³ d'hyposulfite N/10, Ac. 110.

Nous avons mis en contact 20 cm³ d'hyposulfite avec 5 cm³ d'une solution inhibitrice préparée avec l'acétate cuivrique. L'activité qui était de 32 en l'absence d'hyposulfite s'élève à 108 par addition de ce dernier.

L'activité est supérieure à 100, mais ceci doit être attribué à l'action activante de l'hyposulfite. C'est la réactivation la plus nette que nous ayons observée et surtout c'est la seule totale.

Si maintenant nous comparons entre eux les résultats des sept essais différents, nous pouvons en déduire que, d'une façon générale, toutes les

substances précipitant les ions cuivre ou les dissimulant dans des complexes ont réactivé la solution inhibitrice.

Cette réactivation toujours nette n'a jamais été totale, sauf avec l'hyposulfite et la salicylaldoxime.

Nous pouvons cependant conclure que la substance inhibitrice soluble doit son action à la présence du cuivre. Sous quelle forme se trouve ce cuivre? Tel est le problème que nous avons tenté de résoudre.

En premier lieu, nous avons recherché si ce cuivre était sous forme cuivreuse ou cuivrique. Nous avons tout d'abord déterminé à quelles concentrations les sels cuivreux et cuivriques se montraient inhibiteurs de la phosphatase.

Ensuite, nous avons étudié l'action d'oxydants des sels cuivreux sur l'action inhibitrice.

ACTION DES SELS CUIVREUX ET CUIVRIQUES SUR LA PHOSPHATASE -

a)- Sels cuivriques -

Nous avons mis en contact, selon le protocole habituel, la phosphatase d'Amande amère et le β glycéro-phosphate, le milieu étant additionné de quantités variables d'une solution d'acétate cuivrique amenée à pH 5,2. La teneur en cuivre a été estimée par la technique de LEHMANN modifiée par FLEURY et BOUTOT (74).

Inhibition de la phosphatase par diverses doses de sel cuivrique:

Cu^{++} en milligrammes dans 50 cm ³					
du mélange réactionnel	20	40	100	200	600
Activité de la phosphatase	100	100	96	56	0

Lorsque l'inhibition est totale, le sel cuivrique a floculé la protéine, l'inhibition n'apparaît qu'au-dessus d'une certaine concentration en Cu^{++} , elle a l'apparence banale de la précipitation d'un protide par un sel de métal lourd.

b)- Sels cuivreux -

2 gr. de chlorure cuivreux sont mélangés à 10 gr. de chlorure de sodium et de l'eau Q.S. pour 50 cm³ ; le mélange est porté 15 minutes à l'ébullition et filtré.

La teneur en sel cuivreux de la solution obtenue a été déterminée par la technique MOHR-BERTRAND ; nous avons titré manganométriquement le sulfate ferreux formé par réduction du sulfate ferrique par le sel cuivreux. La titration au permanganate n'a été réalisée qu'après addition de sulfate manganoux comme il est d'usage en manganométrie lorsque le milieu est riche en chlorure. 1 cm³ de notre solution renfermait 20 milligr. de Cu à l'état cuivreux.

Inhibition de la phosphatase par diverses doses de sel cuivreux :

Milligrammes de Cu ⁺ dans 50 cm ³								
du mélange réactionnel	2	4	8	16	40	100	140	
Activité de la phosphatase	93	64	25	16	12	7	3,5	

L'action inhibitrice des sels cuivreux est très différente de celle observée avec les sels cuivriques, l'inhibition croît ici progressivement à la quantité de sel cuivreux ajoutée. 4 milligr. de Cu⁺ exercent une inhibition de 36 % tandis que 200 milligr. de Cu⁺⁺ exercent une inhibition de 44 %.

Il faut donc une concentration 50 fois plus forte en Cu⁺⁺ pour exercer à peu près la même inhibition que le sel cuivreux.

Dans les essais avec le sel cuivreux l'action inhibitrice est en réalité plus marquée que ne l'indiquent nos résultats, car le chlorure de sodium utilisé pour augmenter la solubilité du chlorure cuivreux a une nette action activante sur la phosphatase.

Avec 5 cm ³ de ClNa à 20 %	Ac = 138
Avec 7 cm ³ de ClNa à 28 %	Ac = 150

Cette activation n'est pas spécifique au chlorure de sodium, car, avec le chlorure de potassium à 10 %, nous avons avec 10 cm³ Ac. 135 et avec 15 cm³ Ac. 146.

Ces faits sont à rapprocher des activations observées en présence d'hyposulfite de sodium et de sulfocyanure de potassium. Il semble donc que

tous ces sels alcalins activent la phosphatase d'Amande, ils agissent peut-être en modifiant la dispersion des protides et diminuant la taille du support colloïdal, c'est un fait connu que certains électrolytes font passer les desmoenzymes en lyoenzymes (BAMANN (10)).

Les deux chlorures n'agissent pas en modifiant le pH du milieu, car en leur présence on note une très faible acidification qui devrait au contraire diminuer l'activité de l'enzyme.

Ces observations ont été le point de départ de recherches de COURTOIS et BOSSARD (48). Divers sels alcalins en particulier les iodures, bromures, sulfocyanures exercent une action activatrice sur les phosphatases végétales. Cette activation est plus ou moins marquée selon l'origine de l'enzyme. La phosphatase de tubercules de pomme de terre est la plus sensible à l'activation. Il est vraisemblable que ces sels favorisent la réaction phosphatasique en modifiant la dispersion des micelles d'enzyme. D'ailleurs la plupart des phosphatases végétales se comportent comme des globulines.

Nous avons essayé d'inhiber la phosphatase par dissolution d'iodure cuivreux dans une solution concentrée d'iodure de potassium.

0 gr. 20 d'iodure cuivreux sont suspendus 10 minutes dans 20 cm³ d'iodure de potassium à 10 % portés à l'ébullition. La présence de l'iodure rendrait impossible le dosage du Cu⁺ par la technique de BERTRAND, nous avons cependant constaté que la solution renfermait un sel cuivreux, car elle s'est colorée en rose pâle par le ferrocyanure. Cette solution n'a pas inhibé la phosphatase, tout au contraire, elle l'a activée.

Avec 5 cm³, Ac. 127 ; 10 cm³, Ac. 132.

Il est probable que l'action activante du sel alcalin à forte concentration contrebalance la faible inhibition des traces de sel cuivreux dissous.

c)- Inhibiteur -

Formé par le mélange d'acétate cuivrique et d'acide ascorbique.

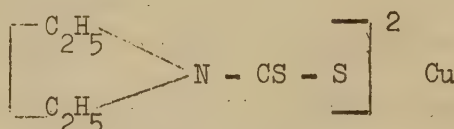
Nous avons étudié l'action de diverses doses d'inhibiteurs sur la phosphatase : 0 gr. 90 d'acide ascorbique sont dissous dans 50 cm³ d'eau, nous ajoutons 30 cm³ de solution saturée d'acétate de cuivre, filtrons et

complétons à 100 au bout de 24 heures.

Le filtrat possède la teinte bleue caractéristique de l'ion Cu^{++} ; nous avons dosé le cuivre par la technique de FLEURY et COURTOIS (79) dont nous résumons brièvement le principe.

1°/- Destruction de la matière organique : lorsque les substances à détruire sont en faible proportion, la solution est concentrée dans un ballon de Kjeldahl en présence de 1 cm³ de SO_4H_2 à 20 % et 40 cm³ d'eau oxygénée officinale ; lorsque le mélange émet des fumées blanches, on laisse refroidir et on ajoute 10 autres cm³ d'eau oxygénée et on concentre à nouveau. Le résidu de minéralisation est neutralisé par l'ammoniaque et amené à 10 cm³.

2°/- Le cuivre est précipité à l'état de complexe par le diéthylthiosulfocarbamate



1 cm³ de solution à doser est additionné de 1 cm³ de solution de sulfocarbamate à 1 % dans le dioxane.

3°/- Le précipité est redissous par addition d'un solvant organique miscible à l'eau (le dioxane et l'acétone conviennent parfaitement). La coloration jaune marron est appréciée à l'électrophomètre de Meunier. Nous avons, d'autre part, étalonné cet appareil en utilisant une solution titrée de cuivre et le même solvant.

Notre solution inhibitrice renfermait 0,6 milligr. de Cu total par cm³, nous avons déterminé l'inhibition en fonction de sa concentration.

Milligrammes de Cu dans 50 cm³

du mélange réactionnel	0,3	0,6	1,2	2,4	3,0
Activité	100	96	82	48	24

2,4 milligr. de cuivre de la solution inhibitrice abaissent l'activité à 48 tandis que 4 milligr. de cuivre à l'état cuivreux l'abaissent à 64.

Les inhibitions en fonction de la concentration en cuivre total sont

du même ordre de grandeur ; il faut toutefois remarquer qu'à doses égales l'action inhibitrice de la solution est plus marquée.

La solution renfermait certainement du cuivre cuivrique ; si son action inhibitrice est provoquée par un dérivé cuivreux, ce dernier agit plus intensément que le chlorure cuivreux, remarquons toutefois que ce dernier est à l'état de complexe avec le chlorure de sodium.

Le parallélisme entre l'inhibition par le sel cuivreux et la solution inhibitrice pouvait laisser supposer que cette solution agissait par suite de la présence de sel cuivreux ; nous avons étudié l'action de quelques oxydants sur cette solution.

ESSAIS DE REACTIVATION DE L'INHIBITEUR PAR LES OXYDANTS -

a)- Action de l'air -

Nous avons étudié en premier lieu l'oxygène atmosphérique qui oxyde la plupart des sels cuivreux en solution.

Tout d'abord, la solution inhibitrice conserve la majeure partie de son activité si on la place dans un flacon bouché liège et à demi-rempli. Une solution dont 5 cm³ abaissaient l'activité à 24 a été conservée à la température du laboratoire pendant un mois. Après ce temps : Ac. 46.

Une autre solution dont 5 cm³, Ac. 22, après 50 jours de conservation, Ac. 20.

L'action inhibitrice persiste en majeure partie ou totalité par conservation de la solution.

En faisant barboter pendant 6 heures à 20° un courant d'air, l'activité ne s'élève que de 15 à 17.

Enfin, en faisant barboter un courant d'air dans l'inhibiteur disposé dans un flacon immergé jusqu'au col dans un bain-marie bouillant, on obtient une liqueur brune et trouble clarifiée par filtration ; l'activité, qui était avant chauffage de 22, s'est élevée à 46.

Le chauffage fait disparaître une partie de l'action inhibitrice :

5 cm³ d'inhibiteur sont évaporés puis desséchés 24 heures à 100°, l'activité s'élève de 24 à 61.

b)- Action du peroxyde d'hydrogène -

En maintenant une heure sur un bain-marie bouillant 1 cm³ d'une solution concentrée d'inhibiteur et 10 cm³ d'eau oxygénée officinale, l'activité qui était de 25 n'a pas varié.

Si l'on évapore à sec à 100° 5 cm³ d'inhibiteur et 10 cm³ d'eau oxygénée officinale, l'activité s'élève de 24 à 83.

c)- Action du molybdate d'ammonium -

Les sels cuivreux sont oxydés par l'acide molybdique (GOLSE (91)).

Avec 0 gr.50 de molybdate d'ammonium, il n'y a eu aucune réactivation, mais le molybdate exerce une action inhibitrice presque totale à cette concentration.

Cette observation a été le point de départ d'un travail de BOSSARD (49) (22) qui a montré que l'acide molybdique était l'un des inhibiteurs les plus spécifiques des phosphatases acides. COURTOIS et ANAGNOSTOPOULOS (42) ont montré que les acides tungstique et vanadique agissent d'une façon analogue.

d)- Action du sulfate ferrique -

A de fortes doses c'est un inhibiteur de la phosphatase ; 2 et 4 cm³ de la solution de BERTRAND à 5 % dilués et neutralisés à pH 5,2 inhibent presque totalement la phosphatase.

Nous avons utilisé la solution précédente diluée au 1/10e. Avec 1 cm³ de cette solution, Ac. 85. Avec 1 cm³ de la même solution puis contact de deux heures à la température ordinaire avec 5 cm³ d'inhibiteur, Ac. 32. Avec 5 cm³ d'inhibiteur seul, Ac. 22.

Le sulfate ferrique n'a donc fait diminuer que très faiblement l'action inhibitrice.

e)- Action des alcalis -

5 cm³ d'inhibiteur sont neutralisés à la phtaléine et mis en contact 24 heures avec 5 cm³ de soude normale ; après neutralisation et filtration l'activité qui était de 32 s'est élevée à 59.

L'interprétation de cette série d'essais est assez délicate, les agents oxydants n'exercent qu'une action réactivante très minime, en tout cas bien inférieure à celle des réactifs précipitant ou bloquant le cuivre.

Si l'action inhibitrice est due à un dérivé cuivreux, ce dernier devrait être d'une remarquable stabilité.

CONCLUSIONS DE CE CHAPITRE -

Les substances qui précipitent le cuivre ou le dissimulent à l'état de complexes font disparaître en grande partie l'action inhibitrice de la substance soluble.

Sauf en deux cas, la réactivation n'a jamais été totale.

Nous avons cherché si ce cuivre était sous forme cuivreuse ou cuivrique.

Pour obtenir une diminution d'environ 50 % de l'activité phosphatase, il faut 50 fois moins de $(Cu)^+$ que de $(Cu)^{++}$.

L'inhibiteur soluble contient une quantité de cuivre total exerçant à peu près la même inhibition que la même quantité de cuivre cuivreux. Il semblerait donc agir par son $(Cu)^+$. Cependant l'oxygène atmosphérique dans diverses conditions et le sulfate ferrique ne font disparaître qu'une fraction infime de l'action inhibitrice ; si le cuivre est à l'état cuivreux, il serait dissimulé aux oxydants et non dissimulé aux réactifs généraux des sels de cuivre.

Par la suite, COURTOIS (39) a poursuivi l'étude de cet inhibiteur soluble. Il n'est pas colloïdal car il franchit les membranes utilisées pour la dialyse et l'ultra-filtration.

COURTOIS considère que l'inhibiteur est un complexe cuivrique des produits d'oxydation de l'acide ascorbique réductibles par l'hydrogène sulfuré en cet acide ascorbique.

Ce complexe est relativement stable et d'action spécifique ; les complexes cuivriques de l'éthylènediamine de l'acétylacétone et de l'acide oxalique n'inhibent pas la phosphatase.

----- oOo -----

Chapitre IV

ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTION DE L'ACIDE DIOXYMALEIQUE
ET DE SES PRODUITS D'OXYDATION SUR LA PHOSPHATASE D'AMANDE

* * *

*

Les composés chimiques qui présentent le plus d'analogies de comportement avec l'acide ascorbique sont les réductones d'EULER et l'acide dioxymaléique. Ces corps, bien que dépourvus d'activité antiscorbutique, présentent des propriétés réductrices accentuées similaires à celles de l'acide ascorbique. De nombreux travaux ont étudié leur influence dans les processus biochimiques d'oxydo-réduction VON EULER (66).

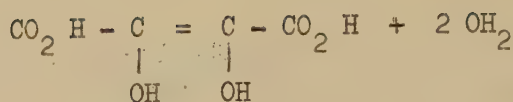
Nous avons réalisé quelques essais en vue de rechercher si, en présence de sels cuivriques, l'acide dioxymaléique provoquerait la formation d'inhibiteurs de la phosphatase analogues à ceux qui apparaissent avec l'acide ascorbique.

MAPSON (123) a d'ailleurs signalé que le mélange acide dihydroxymaléique + sel cuivrique inhibait l'uréase de la fève Jack.

Nous avons utilisé un échantillon d'acide dioxymaléique qui nous a été obligeamment procuré par M. BOSSARD à qui nous exprimons nos plus vifs remerciements.

Ce corps a été préparé selon la technique de NEUBERG et SCHWENK (129): oxydation de l'acide tartrique par le peroxyde d'hydrogène en présence de sulfate ferreux. La réaction est effectuée à environ - 5° par suite de l'instabilité de l'acide dioxymaléique.

Le corps utilisé se présentait en cristaux lamellaires, blancs renfermant 2 molécules d'eau de cristallisation.



Il est assez peu soluble dans l'eau et ses solutions sont instables, il se décarboxyle rapidement en aldéhyde glycolique et anhydride carbonique.

Nous avons utilisé des solutions M/100 préparées au moment de l'emploi

ACTION DU SYSTEME ACIDE DIOXYMALEIQUE - SEL CUIVRIQUE SUR LA PHOSPHATASE -

Nous avons introduit successivement dans un flacon stérile :

- glycérophosphate de sodium M/25 amené à pH 5,2
par de l'acide acétique 20 cm³
- Tampon acide citrique M/3 soude ou acide acétique
M/2 - soude de pH 5,2 5 cm³
- Suspension d'émulsine d'amandes amères à 1 p. 100 5 cm³
- Sulfate cuivrique M/100 0 à 4 cm³
- Soude N/100 quantité nécessaire pour neutraliser
à pH 5,2 le mélange acide dioxymaléique - sulfate
cuivrique 0 à 4 cm³
- Eau distillée q. s. p. 50 cm³

L'acide phosphorique libéré est titré après contact de 24 heures à la température de 37°.

TABEAU XX - ACTION DE L'ACIDE DIOXYMALEIQUE EN PRESENCE DE SELS
CUIVRIQUES SUR LA PHOSPHATASE -

cm3 de sulfate cuivrique M/100	cm3 d'acide dioxymaléi- que M/100	Tampon acétique		Tampon citrique	
		milligr. P205 libérés	activité relative	milligr. P205 libérés	activité relative
0	0	11	100	9	100
0	4,0	10,5	95		
1,0	1,0	0,5	0	9	100
2,0	1,0	0,5	0	9	100
4,0	2,0	0,5	0	7	77
4,0	4,0	0,5	0	6	66
4,0	0	3,0	27	9	100

Un premier fait se dégage indiscutablement de ces essais : les différences observées entre les comportements en présence de tampon citrique et en présence de tampon acétique.

En présence de tampon acétique, il y a inhibition presque totale tandis qu'avec le tampon citrique, elle ne se manifeste assez modérément qu'à partir d'une certaine concentration en acide dioxymaléique. Les propriétés complexantes de l'acide citrique paraissent donc restreindre nettement l'oxydation cuivrique de l'acide dioxymaléique. Avec l'acide ascorbique (Tableau XIV) la présence d'acide citrique dans le milieu ne réduisait que faiblement l'inhibition, nous avons en effet observé une très nette inhibition avec le mélange acide ascorbique - sel cuivrique en présence du tampon cuivrique.

Nous avons alors recherché si l'inhibition observée provenait simple-

ment de la précipitation d'oxyde cuivreux dans le milieu ou si elle était accentuée par la formation d'une combinaison cuivrique des produits d'oxydation de l'acide dioxymaléique.

A 20 cm³ de solution fraîchement préparée d'acide dioxymaléique M/100 nous ajoutons des doses variables de sulfate cuivrique M/10 et de l'eau distillée q. s. p. 40 cm³. Après quatre heures de contact à la température du laboratoire, nous neutralisons à pH 5,2 par de la soude N/10 et complétons à 50 cm³. Nous séparons par décantation le liquide surmontant le précipité cuivreux et déterminons l'action de 5 ou 10 cm³ sur l'hydrolyse de 20 cm³ de β glycérophosphate M/25 à pH 5,2 par 5 cm³ de suspension d'émulsine d'aman des amères. Après 24 heures à 37° nous procédons au dosage de l'acide orthophosphorique libéré.

Une série d'expériences fut réalisée en présence de tampon acétique et l'autre en présence de tampon citrique.

TABLEAU XXI - ACTION DES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE DIOXYMALEIQUE
SUR LA PHOSPHATASE -

cm ³ de SO ₄ Cu M/10 ajoutés à l'acide dioxymaléique	cm ³ de solution ajoutés	Activités relatives	
		Tampon acétique	Tampon citrique
0,5	5	78	96
	10	66	96
1,0	5	78	
	10	44,5	
2,0	5	55	96
	10	27	91
4,0	5		100
	10		91

Il apparaît donc un inhibiteur soluble manifestant une nette action en présence du tampon acétique, par contre, le tampon citrique ne permet pas de déceler d'inhibition appréciable. Tout se passe donc comme si l'inhibiteur devait son action à la présence du cuivre associé à un produit d'oxydation de l'acide dihydroxymaléique ; l'acide citrique bloquant le cuivre supprime l'action inhibitrice.

CONCLUSIONS -

L'association des sels cuivriques à l'acide dioxymaléique inhibe nettement la phosphatase. La majeure partie de l'inhibition peut être reliée à la précipitation d'oxyde cuivreux, il apparaît en outre un inhibiteur soluble dont l'action paraît liée à la présence de cuivre car l'acide citrique fait disparaître l'action de l'inhibiteur soluble.

----- oOo -----

TROISIEME PARTIE

ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR LES PHOSPHATASES

* * *

*

INTRODUCTION -

Au cours de ses recherches sur les protéines des graines d'Amande, R. BARRE (15) put observer que les deux principales fractions protéiques : l'amando-albumine et l'amando-globuline étaient susceptibles de se combiner à l'acide phytique (inositohexaphosphorique). Parmi les 18 composés phosphorés étudiés, l'acide phytique est un de ceux qui forment les combinaisons les plus stables et peut-être même celui qui donne la plus stable.

J. COURTOIS et R. BARRE (15) (14) (45) (46) purent généraliser les résultats obtenus avec les deux principales fractions protéiques des amandes à deux autres protéines : l'une également d'origine végétale la légumine du Pois, l'autre d'origine animale, l'insuline.

Avec toutes les protéines étudiées, les résultats sont similaires et les composés phosphorés peuvent être classés d'après leur comportement et d'une façon peut-être un peu schématique en deux principaux groupes :

1°/- le premier groupe comprend en particulier, les acides orthophosphorique, pyrophosphorique, β glycérophosphorique, phénylphosphorique et p. nitrophénylphosphorique. De pH 6,0 à pH 3,5, ces divers acides diminuent faiblement la solubilité de la protéine au voisinage de son point isoélectrique. La teneur en phosphore du précipité protéique formé varie peu avec le pH où il est précipité et demeure voisine de 1,5 p. 100.

2°/- le second groupe comprend les acides tripolyphosphorique, polyphosphorique dérivé du sel de Graham, trimétaphosphorique, tétramétaphosphori-

que, méthyldioxynaphtalènediphosphorique (synkavit Roche), inositoltriphosphorique obtenu par hydrolyse phytasique partielle de l'acide phytique et enfin l'acide phytique. Avec ces divers dérivés phosphorés, les protéines sont insolubilisées en-dessous de leur point isoélectrique jusqu'à des pH très acides voisins de 2,5, 2,0. La teneur en phosphore du précipité s'élève de pH 5,0 jusqu'à pH 2,0 où elle atteint des valeurs voisines de 4 p. 100.

Les acides saccharosemonoorthophosphorique, fructosediphosphorique, phosphoglycolique, morpholinoéthanolphosphorique et benzylphosphorique occupent une position intermédiaire moins différenciée et assurent en quelque sorte la transition entre les deux groupes.

J. COURTOIS et R. BARRE (15) (46) ont étudié d'une façon plus détaillée les combinaisons avec un représentant de chacun des deux groupes : acides β glycérophosphorique et phytique. L'acide glycérophosphorique se combine suivant une réaction d'équilibre régie par la loi d'action de masse, la réaction suit l'isotherme de Langmuir. Tout au contraire, la proportion d'acide phytique combiné est indépendante de sa concentration dans le milieu dès que cette dernière dépasse un certain seuil. A pH 6,5, l'acide phytique ne paraît pas associer plusieurs molécules d'amando-albumine car il n'en modifie pas la vitesse de sédimentation par ultracentrifugation. A ce même pH 6,5, il provoque par contre l'association des fractions amando-albumine et amando-globuline ; l'association est complète et sa mobilité par électrophorèse très accrue. Cette association se manifeste également à un autre point de vue ; R. BARRE (14) a observé que par dialyse d'un mélange d'amando-albumine et amando-globuline, cette dernière était progressivement insolubilisée, la fraction albuminique demeurant en solution. Lorsque l'on ajoute de l'acide phytique au mélange de ces deux protéines, il semble se former une association des deux protéines ; si l'on procède à une dialyse, l'amando-globuline n'est pas précipitée.

J. COURTOIS et R. BARRE (46) ont présenté divers arguments permettant de considérer que l'acide phytique paraît former une combinaison saline avec les fonctions ionisables basiques de la protéine. Cette capacité de combinaison est d'ailleurs diminuée de 75 % si l'on fait disparaître les

fonctions amines libres de la protéine en les diazotant par l'acide nitreux.

Les résultats des courbes de titration tendent à indiquer qu'en milieu de pH inférieur à 5,0, l'acide phytique se combine aux groupements basiques qui viennent d'être débloqués de leurs combinaisons intramoléculaires avec les deuxièmes groupements carboxyliques des acides aspartique et glutamique.

Cet ensemble de données et quelques essais préliminaires montrent que l'acide phytique semble pouvoir être utilisé pour titrer les groupes ionisables basiques des protéines.

Ce comportement de l'acide phytique et sa présence en association avec les protéines dans les graines d'Amande que nous avons rapporté dans la 1ère partie p.29 posent divers problèmes enzymologiques que nous nous sommes efforcés de résoudre dans cette IIIème partie.

I - L'acide phytique forme de nombreux sels métalliques très insolubles comme en particulier ceux de fer et aluminium. Avec les alcalino-terreux, il s'unit pour former soit des sels peu solubles, soit des complexes très stables.

YANG (173) a signalé que si l'on ajoute progressivement à une solution de phytate de sodium du chlorure de calcium, la solution demeure tout d'abord limpide, puis précipite. Dans la solution limpide, le calcium est complexé par l'acide phytique car il n'est plus précipité par les orthophosphates et surtout les oxalates. Dans un travail ultérieur, HOFF-JORGENSEN (101) a déterminé la solubilité du phytate de calcium en fonction du pH ; il réussit à montrer que dans une solution de phytate de calcium la plus grande partie de ce métal est associée à l'acide phytique sous forme d'ion complexe.

Plus récemment, NEUBERG et MAND (128) ont signalé que les composés phosphorés biologiques où se trouvent accumulés plusieurs radicaux phosphorés comme l'acide phytique ou l'acide adénosinetriphosphorique (A T P) peuvent former de nombreux complexes métalliques. Ils sont susceptibles en particulier d'empêcher la précipitation des phosphates et carbonates de nombreux métaux à des pH supérieurs à 7,0, de retarder la précipitation du sulfate de baryum, des borate et fluorure de calcium.

De nombreux ions métalliques bivalents sont nécessaires à l'activité des phosphatases alcalines animales I.

Ces résultats confirmés par de multiples auteurs avec les organes les plus divers sont rassemblés dans les revues générales de ROCHE et COURTOIS (148) ROCHE et NGUYEN VAN THOAI (152).

COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et KHORSAND (52) (44) (108) ont observé que divers cations bivalents Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , activaient de façon nette la phosphatase du type III des feuilles.

Il était dès lors permis de se demander si l'acide phytique présent dans les graines d'Amande ne bloquait pas des cations indispensables à l'activité de phosphatases normalement présentes dans ces graines. Ces phosphatases seraient ainsi masquées et ne pourraient manifester leur activité dans la préparation d'émulsine utilisée au cours de nos recherches. Nous avons ainsi été amenés à préparer un échantillon d'enzymes d'Amandes débarrassé d'acide phytique et y rechercher les autres phosphatases éventuellement présentes.

Dans une récente revue sur les esters phosphoriques de l'inositol, J. COURTOIS (41) a formulé les remarques suivantes : "Il est assez curieux de noter qu'à l'exception de la phytase intestinale du rat, toutes les autres préparations agissent en milieu plus ou moins fortement acide. Il est dès lors permis de se demander si l'incapacité des phosphatases alcalines à dédoubler l'acide phytique ne peut être reliée d'une part à l'intervention des métaux bivalents au cours de l'action des phosphatases alcalines et d'autre part à l'aptitude de l'inositohexaphosphate à bloquer ou précipiter ces métaux.

Il serait séduisant d'envisager que l'inaptitude des phosphatases alcalines à hydrolyser l'inositohexaphosphate ne résulterait pas d'une incapacité du co-enzyme à dédoubler les liaisons phosphorées, mais à une paralysie de la phosphatase par l'inositohexaphosphate s'emparant des cations métalliques nécessaires à son activité."

Nous avons donc été ainsi amenés à étudier l'action de la préparation enzymatique d'Amandes débarrassée d'acide phytique sur le glycérophosphate et l'acide phytique.

II - La tendance des protéines à se combiner à l'acide phytique plus aisément qu'à l'acide glycérophosphorique paraît pouvoir être reliée à certaines observations enzymologiques.

Les phytases acides présentent une très forte affinité K_M pour l'acide phytique (LUERS et SIBEREISEN (118)) (RAPOPORT, LEVA et GUEST (145)).

FLEURY et COURTOIS (80) expérimentant avec les enzymes du son, du blé à pH 5,2 et 37° calculèrent que l'affinité K_M pour le glycérophosphate est inférieure à 38. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles obtenues avec d'autres phosphatases végétales (J. COURTOIS (32)).

L'affinité est beaucoup plus élevée pour l'acide phytique et supérieure à 250 en considérant la concentration en liaisons ester phosphorique, soit $K_M > 1500$ pour les six liaisons de l'acide phytique. Cette plus grande affinité K_M pour le phytate que pour le glycérophosphate est à rapprocher de la plus grande aptitude à former des combinaisons avec les protéines que présente l'acide phytique par rapport à l'acide glycérophosphorique.

Il est maintenant assez généralement admis que l'affinité K_M exprime la stabilité de la combinaison apoenzyme-protéine-substrat. De ce fait, les valeurs de K_M plus élevées avec l'acide phytique paraissent résulter de la plus grande aptitude de cet ester à se combiner à la fraction protéique de l'enzyme. Nous avons ainsi recherché si l'acide phytique se combinant à la phosphatase d'Amande entraverait l'hydrolyse du glycérophosphate ; en second lieu, si cette inhibition correspondait au fait que l'acide phytique se combinait à la phosphatase.

A - RECHERCHE DES PHOSPHATASES ET PHYTASES SUSCEPTIBLES D'ETRE NORMALEMENT MASQUEES PAR L'ACIDE PHYTIQUE DANS LA POUDRE D'AMANDES

Nous avons procédé à cette recherche successivement :

- 1 - sur de la poudre d'Amandes délipidée et non débarrassée d'acide phytique.
Cette série d'expériences représentant en quelque sorte un essai témoin.
- 2 - sur une préparation phosphatasique d'Amandes débarrassée d'acide phytique.

Nous décrirons tout d'abord le protocole opératoire utilisé pour obtenir ces deux préparations.

I - POUDRE D'AMANDE DELIPIDEE -

Les Amandes douces sont projetées deux minutes dans l'eau bouillante puis immédiatement séparées par décantation. La pellicule externe riche en tanins qui a gonflé est décollée et peut être aisément éliminée à la main. Les Amandes sont alors broyées au hachoir et placées entre deux papiers filtres, nous les laissons dessécher ainsi à l'air pendant 24 heures. Nous les broyons ensuite au moulin pour obtenir une pâte homogène.

La pâte est introduite dans un percolateur en verre et soumise pendant 24 heures à une lixiviation par l'éther. Nous avons suivi le protocole envisagé par la Pharmacopée Française - VIIe édition - 1949 p. 453-455.

La pâte est retirée du percolateur, étendue sur des feuilles de papier filtre, nous laissons évaporer l'éther à l'air libre pendant 24 heures, la poudre obtenue est à nouveau tamisée. Cette poudre fut utilisée sous forme de suspension à 1 p. 100 dans de l'eau distillée. La poudre est broyée au mortier avec de l'eau distillée contenant 0,5 p. 100 de toluène, nous soumettons alors la suspension à une agitation mécanique de deux heures à la température du laboratoire et utilisons directement cette suspension.

II - OBTENTION D'UNE PREPARATION D'ENZYME D'AMANDE DEBARRASSEE D'ACIDE PHYTIQUE -

Nous avons suivi un protocole opératoire établi à notre intention par R. BARRE, que nous désirons remercier pour son obligeance et ses précieux conseils.

Principe -

Extraction des protéines et enzymes associés par une solution aqueuse de chlorure de sodium.

R. BARRE (14) a en effet pu montrer que les solutions salines diluées extrayaient une plus forte proportion de substances protéiques des amandes que l'eau distillée. D'autre part, la solubilisation de la phosphatase et de la β glucosidase d'Amandes est mieux assurée par cette solution saline.

La majeure partie des protéines et ces enzymes sont alors relargués par le sulfate d'ammonium à pH voisin de 7,0 ; au cours de ce relargage les liaisons acide-phytique - protéines sont rompues et l'acide phytique demeure en solution. La fraction protéique ainsi obtenue ne renferme plus que des quantités très minimes de phosphore organique.

Technique opératoire -

100 gr. de poudre d'Amandes délipidée préparée au cours de l'opération décrite en I sont suspendus dans 1 litre de solution de chlorure de sodium à 10 p. 100 renfermant 0,5 p. 100 de toluène. Nous dispersons par une première agitation mécanique d'une heure, laissons en contact 24 heures et soumettons à une dernière agitation mécanique d'une heure. Toutes ces opérations sont effectuées à une température voisine de 20-25°, la fraction globulinique des amandes étant beaucoup moins soluble à basse température. La solution est passée alors à travers un linge neuf et propre, qui est légèrement exprimé jusqu'à ce qu'il ne s'écoule plus de liquide. A ce moment, nous relarguons par le sulfate d'ammonium purifié par recristallisation ; le sel commercial renferme en effet des quantités non négligeables de fer. Nous utilisons 80 gr. de ce sel pour 100 cm³ de suspension ; nous déterminons par ailleurs la quantité d'ammoniaque nécessaire pour amener 1 gr. de sulfate d'ammonium dissous à la zone de virage au vert du bleu de bromothymol, c'est-à-dire au voisinage de pH 7,0.

La quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour le relargage est disposée dans un mortier, nous lui ajoutons la dose d'ammoniaque calculée d'après l'essai précédent puis, après avoir mélangé, nous introduisons en une seule fois l'extrait d'Amande. Nous triturons énergiquement pour permettre la dissolution du sulfate d'ammonium et éviter des concentrations locales. Après deux heures de contact, la fraction protéique est collectée par centrifugation, desséchée dans le vide en présence d'acide sulfurique et finement pulvérisée.

A partir de 100 gr. de poudre d'Amandes délipidée, nous recueillons environ 66 gr. d'une poudre blanche, renfermant moins de 0,2 p. 100 de phosphore organique, mais contenant une petite quantité de sulfate d'ammonium.

Nous n'avons pas estimé nécessaire de l'éliminer par dialyse pour éviter toute dénaturation inévitable au cours de cette opération ; nous avons par ailleurs vérifié que ces proportions minimales de sulfate d'ammonium n'interfèrent pas au cours de l'hydrolyse phosphatasique.

Comme pour la poudre d'Amandes délipidée, nous avons réalisé nos essais avec une suspension aqueuse à 1 p. 100 de la préparation d'Amandes débarrassée d'acide phytique.

Activité en fonction du pH des deux préparations -

Nous avons procédé à un essai sur une gamme très étendue de pH ; de façon à éviter toute action interférente possible d'un tampon, nous avons acidifié le glycérophosphate par l'acide acétique. En-dessous de pH 4,0, nous ajoutons le tampon M/10 glycine - soude de SORENSEN.

L'ion Mg^{++} est l'activateur le plus régulier des phosphatases alcalines, nous avons de ce fait réalisé une série parallèle d'expériences en présence de sulfate de magnésium M/50 dans le milieu. Les résultats obtenus avec les deux préparations figurent dans les tableaux XXII et XXIII et les figures 6 et 7.

TABEAU XXII - ACTIVITE EN FONCTION DU pH DE LA POUDRE D'AMANDE DELIPIDEE

AVEC ET SANS ADDITION DE SEL DE MAGNESIUM -

Conditions opératoires : β glycérophosphate M/10
 acide acétique N/10
 suspension à 1 p. 100 de poudre
 SO₄Mg M/5 (dans les essais en présence de ce sel)
 Eau distillée q. s. p.

Hydrolyse de 24 heures à 37°

Essai sans addition d'effecteur	pH de l'essai	1,95	2,18	2,88	3,70	4	4,26	4,70	4,95	5,02
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	0	0	0	6,19	9,29	13,94	18,40	21,33	24,79
	pH de l'essai	5,05	5,60	6,5	7,28	7,32	7,70	7,78		
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	21,69	23,23	17,81	3,87	3,87	1,57	1,57		
Essai en présence de SO ₄ Mg	pH de l'essai	2,31	2,98	3,70	4	4,26	4,41	4,52	4,80	5,39
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	0	1,57	6,97	10,84	14,70	20,14	21,68	22,46	24,78
	pH de l'essai	6,16	6,88	7,4						
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	20,14	5,64	2,32						

TABEAU XXIII - ACTIVITE EN FONCTION DU pH DE LA POUDRE D'AMANDE PRIVEE D'ACIDE PHYTIQUE
AVEC ET SANS ADDITION DE SEL DE MAGNESIUM -

Les conditions opératoires sont les mêmes que dans le tableau XXII.

Essai sans addition d'effecteur	pH de l'essai	2,40	2,96	3,79	4,10	4,60	4,70	4,88	4,95	5,20
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	0	1,57	7,74	13,94	29,43	36,40	32,53	32,95	34,08
	pH de l'essai	5,24	5,38	5,57	5,6	5,75	6	6,10	6,25	6,39
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	32,53	30,59	33,09	28,66	33,73	27,04	27,32	26,33	22,11
Essai en présence de SO_4	pH de l'essai	6,80	7,07	7,43	7,55	7,25	8,35	8,70	8,85	
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	13,17	8,94	5,42	3,86	3,10	1,45	0	0	
	pH de l'essai	4,58	4,82	5	5,35	5,8	6	6,48	6,95	7,38
	pourcentage d'hydrolyse du substrat	28,66	32,53	33,30	35,63	34,08	24,79	20,14	10,49	3,09

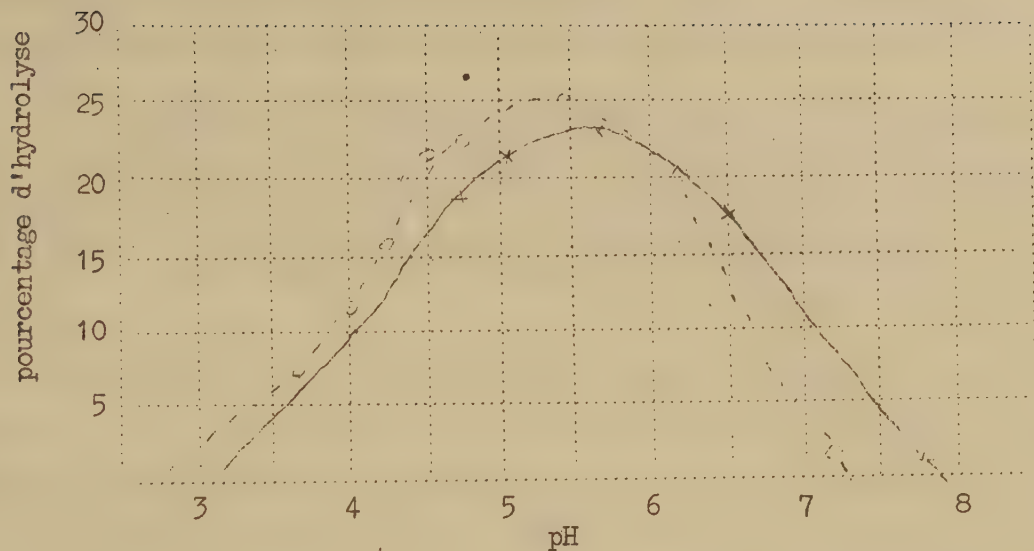


Fig. 6 - Activité en fonction du pH de la poudre d'Amande délipidée avec (---) et sans (—) addition de magnésium.

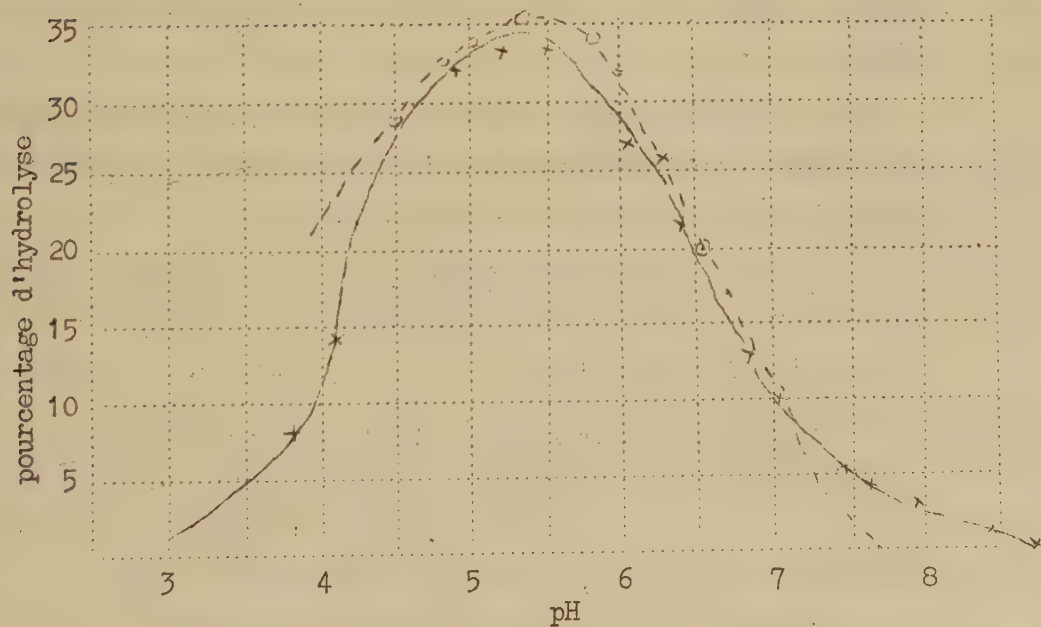


Fig. 7 - Activité en fonction du pH de la poudre d'Amande privée d'acide phytique avec (---) et sans (—) addition de magnésium.

I - La poudre d'Amandes délipidée ne manifeste pas d'activité phosphatasique en dessous de pH 2,9, ceci aussi bien avec ou sans addition de sel de magnésium.

Cette zone de pH est en général très rarement exploitée. Récemment COURTOIS et MANET (53) ont pu y déceler chez le Colibacille une phosphatase et une phytase très acides; ces deux enzymes paraissent agir à partir de pH 1,2 - 1,4 jusqu'à pH 4,0, l'optimum se situe avec l'acide glycérophosphorique vers pH 2,2.

La fraction enzymatique débarrassée d'acide phytique est également inactivée en dessous de pH 2,9.

II - NGUYEN VAN THOAI (132) a pu montrer que des phosphatases des types II et III coexistent dans les graines de Soja. Un extrait acétique des graines fut soumis à l'adsorption sur alumine précipitée directement dans le milieu; la fraction phosphatasique non adsorbée présente un pH optimum de 4,3, tandis que la fraction adsorbée puis éluée possédait une activité optimum à pH 5,6. Quelques données expérimentales de NGUYEN VAN THOAI (132) permettent de supposer que les Amandes douces renferment également une phosphatase du type III.

Les courbes d'activité en fonction du pH que nous avons pu tracer ne manifestent jamais la présence d'un optimum vers pH 4,0 qui s'observe en présence d'une phosphatase du type III.

Nous pouvons cependant remarquer que cet optimum n'apparaît pas toujours nettement lorsque des phosphatases des types II et III sont associées et que l'activité de l'enzyme du type II prédomine sur celle du type III.

COURTOIS et KHORSAND (52) (108) ont rapporté un grand nombre d'observations permettant de considérer que les feuilles renferment associées des phosphatases des types II et III. Selon l'origine de la feuille et les conditions opératoires, on observe de façon très marquée ou à peine apparente l'optimum vers pH 4,0 de la phosphatase III. Tout au contraire, l'optimum de la phosphatase II associée est toujours net vers pH 5,2 - 5,5.

Avec les feuilles fraîches de lierre pour une hydrolyse de 6 heures, la courbe ne présente qu'un seul optimum vers pH 5,2. Si, par contre,

l'hydrolyse est plus accentuée (24 heures), la courbe présente deux optima, le premier vers pH 4,0, le second plus élevé vers 5,0.

D'autre part, avec l'enzyme des feuilles de Belladone, la courbe sans addition d'effecteur ne permet d'observer qu'un maximum vers pH 5,2; mais en présence de sels de magnésium la courbe indique deux pH optima, le premier vers 4,0 - 4,2 correspond même à une hydrolyse plus poussée que le second à pH 5,2.

Pour en revenir à nos essais avec l'Amande, l'absence de deux optima dans la courbe n'est donc pas un argument décisif en faveur de l'absence de phosphatase III associée à la phosphatase II.

L'action des sels de magnésium n'a pas apporté non plus d'arguments péremptoirs en faveur de l'une des alternatives. La poudre d'Amandes délipidée est faiblement activée par le sulfate de magnésium, cette activation apparaît de pH 3,0 à 6,0; vers pH 7,0 par contre, l'ion Mg^{++} exerce une légère inhibition.

Avec la poudre délipidée le sulfate de magnésium à la même concentration M/50 exerce une très minime inhibition en milieu plus alcalin que pH 5,5. Par contre de pH 4,5 à 5,5, nous n'avons observé aucune activation. Ainsi la poudre débarrassée d'acide phytique n'est plus activée dans la zone la plus acide. Tout se passe comme si le sel de magnésium avait bloqué plus ou moins l'acide phytique de la poudre brute, faisant ainsi disparaître son action inhibitrice que nous avons mise en évidence dans la suite de ce travail.

Il apparaît donc que la faible activation magnésienne de la poudre brute n'est en réalité qu'une anti-inhibition par blocage de l'inhibiteur naturel que représente l'acide phytique.

Les phosphatases III d'origine animale ou des Champignons sont très fortement inhibées par l'ion Mg^{++} .

Aussi NGUYEN VAN THOAI (132) a pu considérer avec juste raison en 1942 que "l'inhibition par l'ion magnésium constitue le caractère le plus constant de la phosphatase très acide".

Les recherches ultérieures de COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et KHORSAND (52) (44) (108) n'ont pas permis de maintenir une conclusion aussi absolue ; en effet, les phosphatases du type III des feuilles sont nettement activées par divers cations bivalents Mn^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , et surtout Mg^{++} qui est l'activateur le plus régulier et le plus constant. Il apparaît donc que la préparation phosphatasique débarrassée d'acide phytique ne renferme pas de phosphatase du type III soit inhibée par l'ion Mg^{++} comme celle des animaux et Basidiomycètes, soit activable par le même ion comme les phosphatases des feuilles.

Avec la préparation débarrassée d'acide phytique, les quantités d'acide phosphorique libéré continuent de décroître régulièrement au-delà de pH 7,0 ; il n'y a plus d'hydrolyse pour un milieu plus alcalin que pH 8,4. A pH 7,39 l'ion magnésium ne provoque aucune activation.

Toutes les phosphatases alcalines I décrites jusqu'ici sont plus ou moins intensément activées par l'ion Mg^{++} et ont un pH optimum au voisinage de 8,6 - 9,0.

Aucun résultat ne permet donc d'envisager l'existence d'une phosphatase I même très faiblement active dans les préparations d'Amande douce étudiées. Jusqu'ici, à notre connaissance, il n'a jamais été signalé de phosphatase alcaline du type I chez les végétaux supérieurs. Toutes les recherches pour les identifier ont échoué. C'est ainsi que BOOTH (21) n'a pu déceler dans le Blé de phosphatase active entre pH 8,0 et 10,0.

Ainsi, les préparations d'Amandes étudiées ne contiennent pas de phosphatase I, l'existence d'une faible proportion de phosphatase III demeure des plus hypothétiques, l'enzyme prédominant est la phosphatase du type II à pH optimum vers 5,2 - 5,6.

Ayant ainsi déterminé le pH optimum de nos préparations, nous avons pu aborder l'action du phytate de sodium sur l'hydrolyse phosphatasique.

B - INFLUENCE DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR L'HYDROLYSE DU GLYCEROPHOSPHATE
PAR LA PHOSPHATASE D'AMANDE.

a/- RECHERCHE DE LA PHYTASE -

Nous avons tout d'abord recherché si, à divers pH, la préparation enzymatique débarrassée d'acide phytique était inactive sur ce substrat.

Nous avons mis en contact 10 cm³ de solution de phytate de sodium M/10 en acide phosphorique estérifié, soit M/60 en acide phytique, (solution de phytate de sodium cristallisé - 35 OH₂ à 2,68 gr. p. 100 ⁽¹⁾) 10 cm³ de suspension d'enzyme à 1 p. 100, de l'acide acétique N/10 pour atteindre le pH désiré et de l'eau q. s. pour 50 cm³. Après 24 heures à 37°, nous procédons au dosage de l'acide orthophosphorique susceptible d'être libéré.

Nous n'avons pu déceler la moindre hydrolyse aux pH suivants :
3,65 - 3,85 - 4,22 - 4,52 - 4,82 - 5,22 - 6,4 - 8,8 et 9,7.

Cet ensemble d'essais indique donc que notre préparation est totalement dépourvue de phytase dans toute l'échelle des pH.

b/- INFLUENCE DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR L'HYDROLYSE DU GLYCEROPHOSPHATE A DIFFERENTS pH -

Nous mettons en contact 10 cm³ de suspension à 1 p. 100 d'enzyme débarrassé d'acide phytique avec un mélange de 10 cm³ de glycérophosphate M/10, 10 cm³ de phytate M/10 en acide phosphorique estérifié, de l'acide acétique N/10 pour obtenir le pH désiré et de l'eau distillée q. s. pour 50 cm³. Après 24 heures d'hydrolyse, les pourcentages d'hydrolyse du glycérophosphate évalués d'après la proportion d'acide phosphorique libéré sont les suivants :

(1) Nous remercions la firme CIBA qui nous a obligeamment procuré le phytate de sodium nécessaire pour nos essais.

pH	4,10	4,52	5,0	5,7	6,3	6,68	7,0	7,25
pourcentage d'hydrolyse	6,19	17,04	23,23	27,0	24,79	17,8	9,3	0,77

Dans la figure 8, nous reproduisons la courbe d'activité en fonction du pH établie dans les mêmes conditions en l'absence d'acide phytique et adjoignons celle que nous avons pu tracer d'après ces essais.

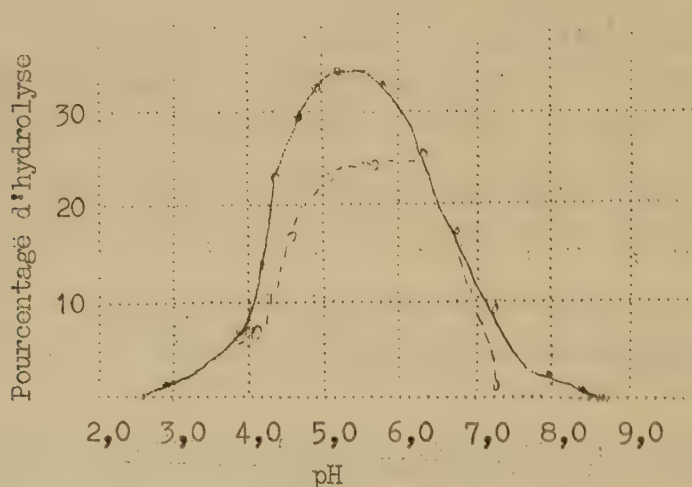


Fig. 8 - Hydrolyse du glycérophosphate par la préparation d'Amandes débarrassée d'acide phytique. (—) sans addition d'effecteur (----) avec addition d'acide phytique.

L'action de l'acide phytique est fonction de la réaction du milieu : inhibiteur net à pH 7,25, il est pratiquement sans action entre pH 6,0 et 7,0 ; il inhibe nettement en-dessous de pH 6,0 et cette inhibition croît avec l'acidité pour être de 20 % environ vers pH 5,7, 40 % à pH 5,0, et plus de 50 % à pH 4,1.

Cette inhibition en-dessous de pH 5,0 correspond précisément à la zone où COURTOIS et BARRE ont montré que l'acide phytique se combinait aux protéines pour former des combinaisons peu solubles.

c/- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ACIDE PHYTIQUE SUR L'INHIBITION -

Les résultats obtenus en-dessous de pH 6,0 permettent d'envisager que l'acide phytique, bien que non dédoublé par la phosphatase, pouvait se fixer sur cette dernière et entraver ainsi l'hydrolyse du glycérophosphate.

Nous avons recherché en premier lieu l'influence de la concentration en acide phytique sur l'inhibition à un pH faiblement acide 5,2 et vers pH 4,0 où les combinaisons acide phytique-protéines sont très stables.

10 cm³ de glycérophosphate M/10 sont opposés pendant 24 heures à 37° à 10 cm³ de préparation d'Amandes débarrassée de l'acide phytique, en suspension à 1 p. 100, des quantités variables d'acide phytique et de l'eau distillée q. s. pour 50 cm³.

TABEAU XXIV - ACTION INHIBITRICE DE DIVERSES DOSES D'ACIDE PHYTIQUE
SUR L'HYDROLYSE DU GLYCEROPHOSPHATE -

pH de l'essai	Concentration moléculaire de l'acide orthophosphorique estérifié sous forme d'acide phytique				
	^{- 3} 2.10	^{- 3} 4.10	^{- 2} 1.10	^{- 2} 2.10	^{- 2} 4.10
4,0	62	62	50	56	31
5,2	86	87	76	58	37

Les chiffres du tableau représentent les activités relatives par rapport au glycérophosphate au même pH. L'hydrolyse de ce dernier en l'absence d'acide phytique atteint 11,2 p. 100 à pH 4,0 et 30,2 p. 100 à pH 5,2.

L'inhibition augmente avec la concentration en phytate, il existe cependant une phase initiale où l'accroissement de la dose de phytate

(2.10^{-3} M à 4.10^{-3} M en PO_4H_3 estérifié) n'accentue pas l'inhibition. Elle est plus accentuée à pH 4,0 qu'à pH 5,2. Avec une préparation non purifiée de phosphatase d'Amande, FLEURY et COURTOIS (80) n'avaient observé qu'une faible inhibition de l'hydrolyse du glycérophosphate par l'acide phytique à pH 5,2. La présence d'acide phytique dans cette préparation impure et de ce fait déjà inhibée avait masqué cette inhibition que nous observons sur une préparation purifiée.

Il est possible d'envisager que dans une première phase l'acide phytique bloque un élément métallique indispensable à l'activité de la phosphatase, réaction qui correspond à l'inhibition par les plus faibles concentrations d'acide phytique. En second lieu se manifesterait l'inhibition par concurrence, celle-ci s'accentuant avec la concentration de phytate.

En vue de vérifier cette interprétation possible, nous avons étudié l'influence de la concentration en glycérophosphate sur l'inhibition par l'acide phytique.

L'enzyme utilisé était la préparation débarrassée d'acide phytique.

TABEAU XXV - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT
SUR L'INHIBITION PAR L'ACIDE PHYTIQUE -

Concentration moléculaire du glycérophosphate			1.10^{-2}	2.10^{-2}	4.10^{-2}	6.10^{-2}
Millig. de P libérés sous forme de PO_4H_3	en l'absence d'acide phytique	1,54	2,86	3,63	3,96	3,96
	en présence d'acide phytique	0,22	0,44	1,98	2,09	2,31
Activité relative en présence d'acide phytique		14	15,3	54	52	58

L'acide phytique paraît donc se comporter comme un inhibiteur concurrent ; en effet, pour une dose constante d'acide phytique, l'inhibition est inversement proportionnelle à la concentration en substrat hydrolysable : le glycérophosphate.

Nous pouvons en outre remarquer qu'à partir d'une concentration 4.10^{-2} M en glycérophosphate la phosphatase est saturée de substrat ; avec une concentration 6.10^{-2} M l'inhibition phytique est moins marquée que pour la concentration 4.10^{-2} M, ceci tend à indiquer la concurrence entre glycérophosphate et phytate pour se fixer sur la protéine enzymatique.

En vue de confirmer qu'il s'agissait bien d'une réaction de concurrence, nous avons étudié l'influence de l'ordre d'addition des réactifs sur l'inhibition.

Nous avons réalisé des essais similaires à pH 4,0 et 5,2.

Voici la série des essais réalisés avec des solutions de glycérophosphate et phytate tamponnées selon l'essai soit à pH 4,0, soit à pH 5,2.

a)- 10 cm³ de glycérophosphate M/10 sont mis en contact avec 10 cm³ de suspension à 1 p. 100 de préparation débarrassée d'acide phytique et 20 cm³ d'eau distillée.

Après une heure à 37°, 0,35 p. 100 du substrat sont dédoublés à pH 4,0 et 3,6 p. 100 à pH 5,2.

b)- identique à a), mais après une heure d'hydrolyse nous ajoutons 10 cm³ de phytate M/10 en acide phosphorique estérifié.

c)- identique à a), mais après une heure d'hydrolyse, nous ajoutons simplement 10 cm³ d'eau distillée.

d)- à 10 cm³ de phytate M/10 (en PO_4H_3 estérifié) nous ajoutons 10 cm³ de suspension à 1 p. 100 de phosphatase débarrassée d'acide phytique et 20 cm³ d'eau distillée.

Après une heure à 37°, nous ajoutons 10 cm³ de glycérophosphate M/10.

Les essais b - c - d sont alors maintenus 24 heures à 37°.

Les pourcentages de glycérophosphate hydrolysés furent les suivants :

	Essai	b	c	d
pH	4,0	3,6	11,0	3,6
	5,2	23,5	31,4	25,0

Si l'acide phytique avait insolubilisé ou complexé un élément métallique indispensable à l'action de la phosphatase, cette dernière devrait être fortement inactivée dans l'essai d) où l'acide phytique a été en contact avec la préparation enzymatique. Il est par ailleurs bien connu que le substrat peut protéger l'enzyme contre les facteurs qui l'inactivent. On pouvait donc s'attendre à ce que dans l'essai b) où l'acide phytique n'a été ajouté qu'après une heure d'hydrolyse par la phosphatase, l'inhibition serait moins accentuée que dans l'essai d). Ainsi, les actions inhibitrices égales observées dans les essais b) et d) à deux pH distincts semblent indiquer qu'il s'agit d'une inhibition concurrente entre acide phytique et acide glycérophosphorique pour se fixer sur la fraction protéique de la phosphatase.

C - ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR LA PHOSPHATASE D'HELLEBORE -

Madame et Monsieur SOSA-BOURDOUIL nous ont aimablement signalé que les hampes florales d'HELLEBORUS FOETIDUS (Renonculacées) manifestaient une appréciable activité phosphatasique. Ils ont obligeamment mis à notre disposition une préparation obtenue à partir des hampes florales, broyées, lavées par l'acétone refroidie à 0°, puis par l'éther et enfin desséchées et pulvérisées.

Nous désirons leur exprimer nos plus vifs remerciements pour avoir préparé cet échantillon à notre intention.

La phosphatase est solidement liée aux tissus comme dans le cas des phosphatases de feuilles ; par extraction aqueuse de la préparation d'Hellébore nous n'avons solubilisé qu'une fraction de l'activité phosphatasique, environ 20 p. 100. Nous avons donc réalisé nos essais avec une suspension aqueuse à 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Nous avons tout d'abord déterminé l'activité en fonction du pH de cette préparation.

10 cm³ de suspension aqueuse à 1 p. 100 sont mis en contact avec 10cm³ de glycérophosphate disodique M/10, de l'acide acétique N/10 de façon à obtenir le pH désiré et de l'eau distillée q. s. pour 50 cm³. Après 24 heures d'hydrolyse à 37°, nous avons obtenu les pourcentages d'hydrolyse suivants :

pH	3,9	4,2	4,4	4,5	4,7	4,8	5,0	5,5	6,4	7,1	7,4
pourcentage d'hydrolyse	16,2	20,1	27,1	28,6	28,6	34,8	33,3	26,0	17,8	13,9	9,2

La poudre d'Hellébore paraît donc renfermer une phosphatase du type II dont le pH optimum se situe vers 4,8 - 5,0.

Nous avons fait divers essais à des pH distincts en présence d'une concentration M/50 en sulfate de magnésium dans le milieu. Les conditions opératoires sont identiques à celles de l'essai antérieur.

pH	4,1	4,9	5,3	6,0	6,8	7,0	7,2
pourcentage d'hydrolyse	23,9	32	26,3	20,1	12,4	11,0	7,0

Ainsi le sel de magnésium s'est révélé pratiquement sans action, il n'a pas fait apparaître une activation vers pH 7,0 indiquant une phosphatase

alcaline. De même vers pH 4,0 - 4,5, il n'a pas provoqué l'activation observée avec les enzymes de feuilles renfermant une phosphatase du type III associée.

Nos essais ne permettent donc d'envisager que la présence d'une phosphatase de type II dans les hampes florales d'Hellébore.

Enfin, il n'existe pas de phosphatase associée ; à pH 4,8 - 5,12 - 6,2 et 9,0, 0,10 gr. de préparation fermentaire n'ont libéré que des quantités infimes d'acide phosphorique en 24 heures d'hydrolyse à 37° à partir de 10 cm³ de phytate M/10 en PO₄H₃ estérifié.

L'acide phytique inhibe l'hydrolyse du glycérophosphate.

TABEAU XXVI - ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR L'HYDROLYSE
DU GLYCEROPHOSPHATE -

Conditions opératoires identiques à celles du tableau XXIV mais en substituant à la préparation d'Amandes 10 cm³ de suspension à 1 p. 100 de poudre fermentaire d'Hellébore.

pH de l'essai	Concentration moléculaire de l'acide orthophosphorique estérifié sous forme d'acide phytique				
	⁻³ 2.10	⁻³ 4.10	⁻² 1.10	⁻² 2.10	⁻² 4.10
4,0	57	59	34,5	42	27
5,2	85	90	70	83	70

Les chiffres de ce tableau représentent les activités relatives par rapport au glycérophosphate au même pH. Le pourcentage d'hydrolyse de ce dernier en l'absence d'acide phytique est de 18,5 p. 100 à pH 4,0 et 38,5 p. 100 à pH 5,2.

Aux deux pH l'inhibition n'augmente pas très régulièrement avec la concentration en acide phytique ; toutefois, pour des doses égales d'acide phytique, l'inhibition est toujours beaucoup plus accentuée à pH 4,0 qu'à pH 5,2. Comme la combinaison acide phytique-protéine est plus stable à pH 4,0 qu'à pH 5,2, il est logique d'envisager qu'avec la phosphatase d'Hellébore l'acide phytique exerce une inhibition concurrente analogue à celle observée avec la phosphatase d'Amande.

D - ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE SUR LA PHOSPHATASE
DES FEUILLES DE MARRONNIER -

COURTOIS et KHORSAND (52) (108) ont mis en évidence dans les feuilles de Marronnier une phosphatase acide. Par la suite, COURTOIS et TRAN VAN AI (59) ont étudié d'une façon plus détaillée les propriétés de cet enzyme ; la majeure partie n'est pas extractible par l'eau et demeure solidement liée aux constituants cellulaires. Cette phosphatase est en particulier activée par les sels de magnésium au voisinage de pH 4,0, par contre les sels de magnésium exercent une action inhibitrice entre pH 4,5 et 6,0.

Nous avons utilisé deux préparations que nous a fournies M. TRAN VAN AI à qui nous exprimons nos plus vifs remerciements.

Echantillon A) -

Les feuilles récoltées en Mai sont lavées, desséchées à l'air, puis à l'étuve à 37° et finement pulvérisées.

Echantillon B) -

Les feuilles récoltées début Octobre sont tout d'abord traitées d'une façon identique à l'échantillon A) ; dans la poudre obtenue, la fraction phosphatasique extractible par l'eau est éliminée en agitant la poudre avec de l'eau ; le résidu collecté par centrifugation est débarrassé des pigments et lipides par lixiviations successives à l'aide de benzène puis d'acétone, cette lixiviation étant réalisée dans une pièce fraîche en utilisant des solvants préalablement refroidis à 0° pour limiter au minimum la dénaturation des protéines enzymatiques. La pâte obtenue, de

couleur marron, est pratiquement dépourvue de pigments chlorophylliens ; elle est desséchée à l'air libre puis sousvide, et enfin pulvérisée.

Nous avons constaté que les deux préparations possédaient une appréciable activité hydrolysante sur le glycérophosphate en milieu acide de pH 4,0 à 6,0. Par contre, nous n'avons pu y déceler aucune action sur l'acide phytique après contact de 24 heures à 37° à différents pH 4,6 - 4,8 - 5,8 et 8,0.

ETUDE DE LA PREPARATION A -

Nous avons observé que l'acide phytique inhibait à pH 4,0 l'hydrolyse du glycérophosphate (Tableau XXVII) ; cette inhibition augmente moins régulièrement avec la concentration en acide phytique que pour les préparations antérieurement étudiées.

L'ion Mg^{++} active faiblement l'hydrolyse du glycérophosphate en l'absence d'acide phytique, en présence de cet ion Mg^{++} l'inhibition par l'acide phytique est contrebalancée et n'apparaît plus que pour une proportion plus élevée d'acide phytique (4.10^{-2} M en PO_4H_3 estérifié).

En vue de préciser cette influence du sel de magnésium, nous avons réalisé des essais plus étendus avec la préparation B de feuilles qui, étant plus purifiée, permettait d'obtenir des résultats plus significatifs.

TABEAU XXVII - ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE EN PRESENCE ET EN L'ABSENCE D'ION MAGNESIUM SUR LA PHOSPHATASE DE FEUILLES DE MARRONNIER (échantillon A) -

Concentration moléculaire de l'acide phosphorique estérifié sous forme d'acide phytique	0	2.10^{-3}	4.10^{-3}	1.10^{-2}	2.10^{-2}	4.10^{-2}
Essais sans addition de sel de magnésium	100	61	61	55	36	48
Essais en présence d'une concentration 8.10^{-3} M en sulfate de magnésium	110	125	110	110	110	74

Conditions opératoires identiques à celles du Tableau XXIV mais en substituant à la phosphatase d'Amande 10 cm³ de suspension à 1 p. 100 de poudre de feuilles desséchées. Les activités relatives sont exprimées par rapport à l'essai témoin sans addition ni d'acide phytique, ni de sel de magnésium dont le pourcentage d'hydrolyse atteint 11 p. 100.

ETUDE DE LA PREPARATION B -

Les résultats du Tableau XXVIII indiquent tout d'abord que l'acide phytique inhibe l'hydrolyse du glycérophosphate. Cette inhibition s'accroît avec la dose d'acide phytique. Toutefois, comme nous l'avons déjà observé avec la préparation A, l'inhibition est moins accentuée avec une concentration d'acide phytique $4 \cdot 10^{-2}$ M en acide phosphorique estérifié que pour une concentration $2 \cdot 10^{-2}$ M.

D'une façon générale, l'ion Mg^{++} a contrebalancé partiellement l'action inhibitrice de l'acide phytique. Cependant, les modalités diffèrent selon la dose et même la nature du sel de magnésium utilisé .

TABLEAU XXVIII - ACTION DE L'ACIDE PHYTIQUE EN PRESENCE ET EN L'ABSENCE D'IONS Ca^{++} et Mg^{++}

SUR LA PHOSPHATASE DE FEUILLES DE MARRONNIER PURIFIEE (échantillon B).

Concentration moléculaire de l'acide phosphorique estérifié sous forme d'acide phytique	0	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
Essais sans addition de sels de calcium ou magnésium	100	70	67,5	57,5	52,5	70,0
Essais en présence d'une concentration $8 \cdot 10^{-4}$ M en sulfate de magnésium	103	96	97	88	66	55
Essais en présence d'une concentration $8 \cdot 10^{-3}$ M en sulfate de magnésium	130	122	112	110	112	110
Essais en présence d'une concentration $8 \cdot 10^{-3}$ M en chlorure de magnésium	123	112	105	95	92	71
Essais en présence d'une concentration $8 \cdot 10^{-3}$ M en chlorure de calcium	82	89	86	86	91	80
Essais en présence d'une concentration $4 \cdot 10^{-2}$ M en sulfate de magnésium	94	94	107	107	100	98

Essais à pH 4,0, conditions opératoires identiques à celles du tableau XXIV mais en substituant à la phosphatase d'Amande 10 cm³ de suspension à 1 p. 100 de préparation de feuilles de Marronnier B.

Activités relatives par rapport à l'essai témoin en l'absence d'acide phytique ou de sels de calcium et magnésium.

14,3 p. 100 du glycérophosphate ont été hydrolysés dans ce témoin.

Avant de chercher à discuter et interpréter ces résultats assez complexes au premier aspect, il nous paraît nécessaire de préciser quelques données indispensables à la compréhension de notre discussion.

A - En premier lieu, nous n'avons réalisé que des essais à pH 4,0 pour trois motifs distincts :

1/- à pH 4,6 nous avons observé de plus fortes inhibitions qu'à pH 5,2 avec les préparations d'Amande et d'Hellébore.

2/- COURTOIS et TRAN VAN AI (59) ont observé que le système phosphatasique des feuilles de Marronnier était assez régulièrement activé par l'ion Mg^{++} vers pH 4,0, tandis qu'il était inhibé au-delà de pH 5,0.

3/- l'acide phytique forme des combinaisons peu solubles avec les sels de magnésium en milieu neutre ou faiblement acide. A pH 4,0 même aux concentrations 4.10^{-2} M en acide phosphorique estérifié sous forme d'acide phytique et 4.10^{-2} M en sulfate de magnésium, il n'apparaît pas de précipité insoluble de phytate de magnésium.

B - Dans ces recherches encore inédites, J.E. COURTOIS, R. BARRE et G. WORMSER ont entrepris l'étude de l'action de divers effecteurs des phosphatases acides sur les combinaisons acide phytique - protéines. Ils nous ont obligeamment communiqué les résultats de leurs essais.

En l'absence de sel de magnésium, 10 millig. d'amando-albumine sont associés à 30,2 millig. de phytate de sodium à 35 OH₂, la protéine est intégralement précipitée de pH 5,0 à pH 2,6 ; la teneur en phosphore du précipité s'élève progressivement de pH 6,0 à pH 3,0 où elle atteint 3 p. 100, elle demeure à peu près invariable de pH 3,0 à pH 2,0.

Si l'on réalise la même série d'essais en présence de 22,8 milligr. de chlorure de magnésium à 6 OH₂, la teneur en phosphore de la fraction protéique précipitée est nettement moins élevée en présence de sel de magnésium, elle atteint au maximum 2,2 p. 100 à pH 2,5.

Au cours d'essais ultérieurs BARRE, COURTOIS et WORMSER ont obtenu des résultats qui semblent indiquer que le magnésium entrave la formation des combinaisons acide phytique-protéine en formant un complexe avec les groupements carboxylique et aminé de la protéine.

Ces divers faits nous permettent donc d'interpréter les résultats du Tableau XXVIII.

1/- A une concentration $8 \cdot 10^{-4}$ M en sulfate de magnésium ce dernier n'active que très faiblement (3 p. 100) la phosphatase, il restreint notablement l'inhibition par l'acide phytique jusqu'à une concentration $2 \cdot 10^{-2}$ M en PO_4H_3 .

Enfin, pour une concentration $4 \cdot 10^{-2}$ M en acide phytique, le magnésium fait disparaître la diminution observée du degré d'inhibition. Ce phénomène assez curieux nous paraît difficile à interpréter, et dans l'état actuel de nos connaissances sur les combinaisons acide phytique-protéines, il paraît prématuré de chercher à proposer une interprétation.

2/- Avec une concentration 10 fois plus élevée en sulfate de magnésium $8 \cdot 10^{-3}$ M la phosphatase est nettement activée, l'acide phytique ne provoque qu'une légère diminution de cette action activante. Deux phénomènes paraissent alors intervenir : l'acide phytique bloque une partie du magnésium activateur, le magnésium bloque l'acide phytique inhibiteur. La résultante se traduit par une légère diminution de l'activité phosphatasique qui demeure cependant accrue par l'ion Mg^{++} présent.

3/- La nature du sel de magnésium utilisé intervient dans l'aptitude à se combiner à l'acide phytique. Si l'on substitue Cl_2Mg $8 \cdot 10^{-3}$ M à SO_4Mg $8 \cdot 10^{-3}$ M la phosphatase demeure nettement activée par Cl_2Mg ; l'acide phytique restreint cette activation et même à partir d'une concentration $1 \cdot 10^{-2}$ M en PO_4H_3 estérifié manifeste une action inhibitrice. Le

chlorure de magnésium est beaucoup plus fortement dissocié que le sulfate, il est donc probable que le magnésium du chlorure se combine plus facilement à l'acide phytique et à la protéine. De ce fait, l'acide phytique à faibles doses restreint l'activation magnésienne et lorsqu'il a combiné tout le magnésium, manifeste son action inhibitrice en se fixant sur la protéine.

- 4/- La diminution de l'inhibition phytique n'est pas spécifique d'un cation activateur de la phosphatase ; le calcium, à la différence du magnésium inhibe légèrement la phosphatase : 18 p. 100 d'inhibition pour une concentration 8.10^{-3} M en Cl_2Ca . En présence de cette dose de calcium, l'acide phytique n'exerce plus d'inhibition, l'on observe même une légère réactivation comme si le calcium et l'acide phytique séparément inhibiteurs neutralisaient leurs effets en se combinant. D'ailleurs, avec la concentration 4.10^{-2} M en phosphore phytique, le calcium est combiné et l'inhibition phytique a tendance à réapparaître.
- 5/- C'est un phénomène similaire qui se manifeste avec une concentration 4.10^{-2} M en sulfate de magnésium. Avec cette dose élevée de sel de magnésium, la phosphatase est légèrement inhibée en l'absence d'acide phytique. Ce dernier, bloquant une partie du magnésium excédentaire, fait apparaître l'activation magnésienne pour des concentrations 4.10^{-3} et 1.10^{-2} M en phosphore phytique.
- 6/- Les résultats de ces essais nous paraissent avoir une portée plus générale que ces quelques essais.

Ils confirment tout d'abord que l'on ne peut tirer des conclusions précises de l'action des effecteurs métalliques que si l'on opère sur des préparations enzymatiques purifiées.

Prenons le cas d'un simple extrait aqueux de cellules végétales il contiendra presque certainement de l'acide phytique. Ce dernier modifiera nettement l'action des effecteurs métalliques. C'est ainsi que dans certains rapports de concentrations, il pourra annuler une activation magnésienne ou au contraire faire disparaître une inhibition calcique.

Il est en outre fort possible que l'acide phytique soit l'inhibiteur naturel ou tout au moins l'un des composants de ces inhibiteurs naturels décelés dans de nombreuses préparations phosphatasiques d'origine végétale.

D'autre part, pour les recherches sur les phosphatases et les effecteurs métalliques, il est indispensable de prendre en considération l'aptitude à se combiner ou à complexer les éléments métalliques des substrats. Lorsqu'on cherche à différencier les phosphatases spécifiques de substrats distincts d'après l'intensité de l'activation ou de l'inhibition par un élément métallique on doit s'attendre à ce que le dérivé phosphoré qui a les propriétés complexantes les plus accentuées soit plus faiblement activé ou moins fortement inhibé qu'un autre dérivé phosphoré à propriétés complexantes moins marquées et dédoublables par le même enzyme.

C'est ainsi que COURTOIS et PEREZ (56) avaient remarqué que l'ion Mg^{++} activait beaucoup plus faiblement l'hydrolyse du phytate que celle du glycérophosphate par la préparation enzymatique du Seigle.

De même l'ion Ca^{++} qui inhibait faiblement l'hydrolyse du glycérophosphate par l'enzyme du Radis était sans action sur l'hydrolyse du phytate.

Ces auteurs n'avaient pas voulu tirer de conclusions trop poussées de ces différences de comportement ; précisément les essais que nous avons réalisés montrent que l'acide phytique ayant complexé calcium et magnésium avait de ce fait atténué leur action sur l'hydrolyse phytasique.

CONCLUSIONS DE LA III^e PARTIE

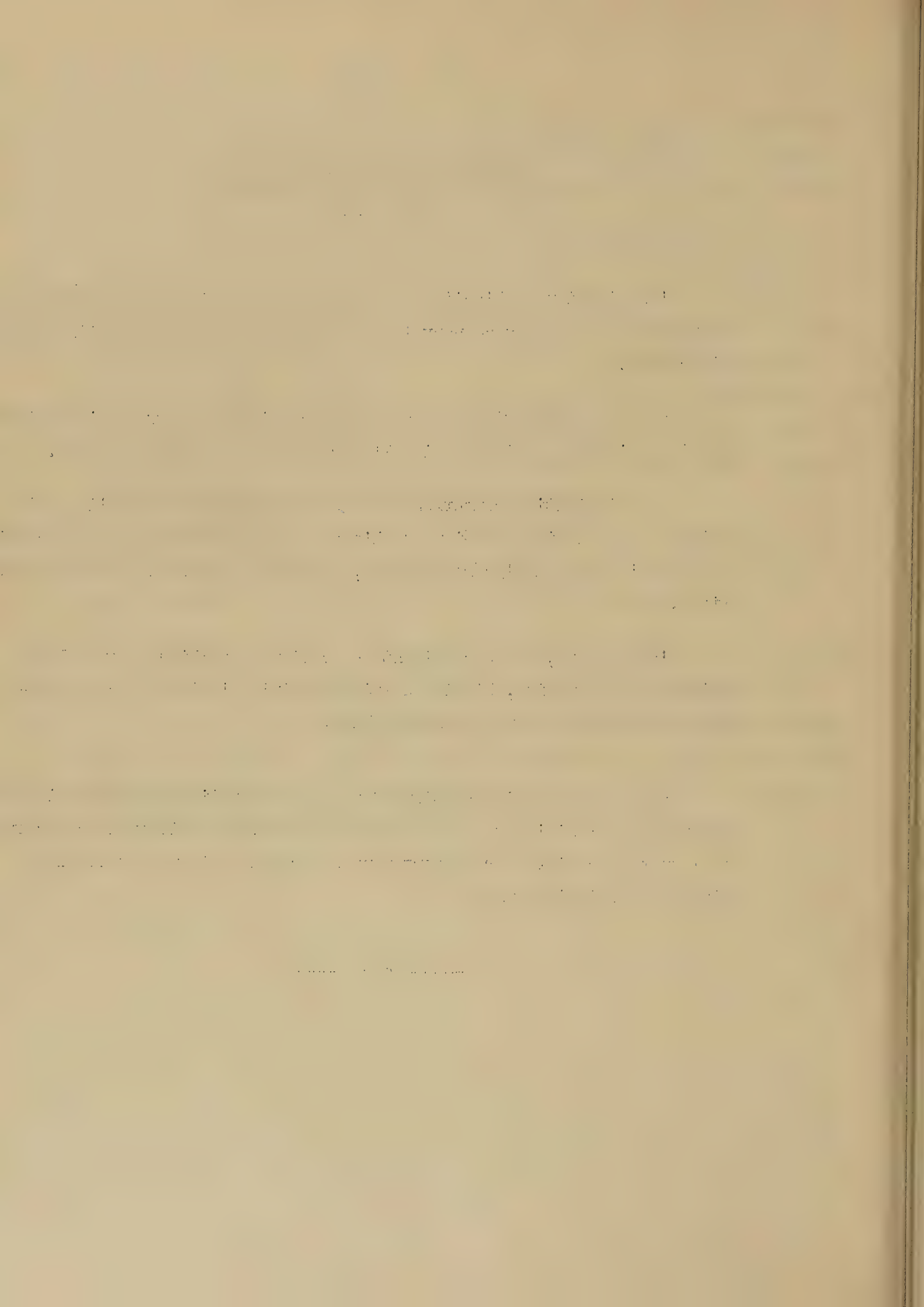
L'élimination de l'acide phytique des préparations phosphatasiques d'Amande ne démasque pas de nouvelles phosphatases isodyniques qu'il aurait pu inactiver.

Dans les préparations de phosphatases acides dépourvues d'activité phytasique l'acide phytique inhibe l'hydrolyse des glycérophosphates.

Cette inhibition concurrente se manifeste par le fait qu'il peut se combiner à la fraction protéique de l'enzyme et entraver dès lors la combinaison de l'enzyme au glycérophosphate, première étape de la réaction enzymatique.

D'autre part, en se combinant aux cations métalliques comme le calcium et le magnésium, l'acide phytique modifie l'action de ces effecteurs sur l'hydrolyse du glycérophosphate.

La présence d'acide phytique dans les préparations phosphatasiques non purifiées d'origine végétale peut donc nettement modifier leurs propriétés et en particulier leur comportement en présence d'ions métalliques activateurs ou inhibiteurs.



C O N C L U S I O N S

* * *

*

Nous avons étudié l'action de la phosphatase d'Amande sur un certain nombre d'esters phosphoriques.

- I - Cette phosphatase a hydrolysé tous les monoesters étudiés, quatre esters d'alcools saturés : méthylique, n-propylique, n-butylique, isobutylique, un d'alcool éthylénique : alcool allylique ; l'ester de l'éthylène glycol ; deux esters d'oses : le fructofuranose-6-phosphate (ester de NEUBERG) et le fructofuranose 1-6-diphosphate (ester de HARDEN et YOUNG) ; le nucléinate de sodium officinal est également hydrolysé. Nous avons déterminé pour tous ces substrats la courbe d'activité en fonction du pH ; ces courbes présentent toutes la même allure et le pH optimum se situe aux alentours de 5,6. Il semble que ce soit la même monoestérase qui hydrolyse tous ces corps.

La phosphatase d'Amande ne paraît pas renfermer de diestérase active ; l'hydrolyse de solutions de diphényl-orthophosphate à divers pH est insignifiante après une semaine de contact avec l'émulsine.

Un triester, le triphénylphosphate, n'est pratiquement pas décomposé après un séjour prolongé en présence d'émulsine.

L'émulsine est également sans action sur l'inositophosphate de sodium cristallisé. Dans un mélange inositophosphate-glycérophosphate de sodium, ce dernier substrat est seul hydrolysé.

Une étude détaillée de l'hydrolyse de l'ester de HARDEN et YOUNG nous a montré que l'émulsine déphosphorylait simplement ce substrat sans intervention accessoire de la zymohexase et de la phosphohexokinase.

II - Nous avons déterminé l'affinité K_M de la phosphatase de l'émulsine pour quelques monoesters ; cette affinité K_M est l'inverse de K_m constante de dissociation moléculaire de la combinaison enzyme-substrat.

L'affinité est un peu plus forte pour le méthylphosphate que pour les α et β glycérophosphates. La présence de fonctions alcool accroît l'affinité qui est beaucoup plus forte pour les glycérophosphates que pour les n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutylphosphates. L'accroissement de longueur de la chaîne carbonée diminue l'affinité.

III - Nous avons étudié l'action de différents composés chimiques sur l'hydrolyse de divers monoesters et du nucléinate de sodium.

L'hydrolyse de tous ces substrats a été influencée de semblable façon par les corps étudiés ; nous pouvons donc considérer qu'ils sont tous hydrolysés par la même phosphatase : une phosphomonoestérase II de la classification habituelle des phosphatases.

- a)- Les sels de magnésium n'exercent aucune action activante ; ils présentent même, en général, une faible action inhibitrice.
- b)- Le fluorure de sodium est un inhibiteur énergique ; son action inhibitrice croît avec la concentration en substrat. Ce fait observé avec divers monoesters permet de différencier la phosphatase végétale II d'Amande des phosphatases animales II.

Les phosphatases de la prostate et de l'urine sont, en effet, inhibées d'une façon inversement proportionnelle à la concentration en substrat.

Les sels de calcium, cuivre, fer ne réactivent pas la phosphatase inhibée par le fluorure.

- c)- Les oxydants : iode, peroxyde d'hydrogène, inhibent la phosphatase.
- d)- Le fluorure de sodium et le chlorure de magnésium n'exercent aucune action sur l'hydrolyse du salicoside par la glucosidase d'Amande et du saccharose par la sucrase d'Amande.

IV - L'acide ascorbique n'exerce qu'une inhibition minime ou nulle sur l'hydrolyse de divers monoesters par la phosphatase d'Amande. Oxydé par les sels cuivriques, c'est, par contre, un inhibiteur énergique.

Nous avons cherché à préciser la nature de cette inhibition.

1°/- L'acide ascorbique oxydé par d'autres corps n'est pas inhibiteur. Nous avons utilisé comme oxydants :

a)- le nitrate ferrique ;

b)- le bleu de méthylène ;

c)- l'iode en milieu acide qui oxyde l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique ;

d)- l'iode en milieu alcalin qui oxyde plus profondément l'acide ascorbique en acides thréonique et oxalique ;

e)- le permanganate de potassium qui conduit à l'acide thréonique.

2°/- Lorsque l'on oxyde l'acide ascorbique par le sulfate cuivrique en présence de l'enzyme, l'inhibition est beaucoup plus forte qu'en ajoutant à l'enzyme le produit de la réaction sel cuivrique-acide ascorbique débarrassé par filtration du précipité formé.

Nous avons donc étudié séparément l'action inhibitrice du précipité et de la solution.

3°/- Le précipité cuivreux ne cède pas par lavage de substance inhibitrice soluble ; c'est à l'oxyde cuivreux précipité que l'on peut rapporter une partie de l'action inhibitrice. Par mise en contact de la phosphatase d'Amande avec de l'oxyde cuivreux, elle perd presque la totalité de son activité. Ce fait n'est pas spécifique de la phosphatase d'Amande car d'autres hydrolases sont presque totalement ou totalement inactivées par contact avec de l'oxyde cuivreux : β glucosidase d'Amande, maltase, sucrase, β glucosidase et phosphatase de l'Aspergillus orizae.

Le chlorure cuivreux en solution est, d'autre part, un inhibiteur énergique de la phosphatase d'Amande. Son action inhibitrice est considérablement plus forte que celle des ions cuivriques.

4°/- La substance inhibitrice soluble doit son action à la présence de cuivre. Tous les réactifs qui précipitent le cuivre ou le bloquent à l'état de complexes diminuent ou font disparaître l'action inhibitrice de la substance soluble : hydrogène sulfuré, salicylaldoxime, cyanure, ferrocyanure, sulfo-cyanure, hyposulfite.

L'inhibiteur soluble et la solution de chlorure cuivreux exercent des inhibitions du même ordre pour des teneurs en cuivre égales. Ceci pourrait laisser croire que l'inhibiteur soluble agit sous forme de dérivé cuivreux. L'inhibition ne disparaît pas par barbotage prolongé d'un courant d'air à la température ordinaire ou à 100° ou par contact avec du sulfate ferrique.

Nous n'avons pu réussir à isoler la substance inhibitrice soluble ; elle n'est pas précipitée par l'alcool fort et l'éther.

Dans la solution évaporée à sec on peut l'extraire par l'alcool à 90°, elle est insoluble dans l'éther et très peu soluble dans l'acétone.

5°/- Au cours de ces essais, nous avons pu accessoirement observer l'action de quelques composés chimiques sur l'hydrolyse du β glycérophosphate : les chlorures alcalins (sodium et potassium) en solutions concentrées accroissent très nettement l'activité phosphatasique ; l'hyposulfite de sodium et le sulfocyanure de potassium sont activateurs à un moindre degré. Le cyanure et ferrocyanure de potassium sont sans action appréciable.

La salicylaldoxime inhibe faiblement et le molybdate d'ammonium totalement.

V - Nous avons en outre étudié l'acide dioxymaléique, diénol oxydable comme l'acide ascorbique.

L'association de sels cuivriques à l'acide dioxymaléique provoque une nette inhibition de la phosphatase. Il apparaît que l'oxyde cuivreux formé est la principale cause de cette inhibition. Il se forme aussi un inhibiteur soluble ; son action paraît être en relation avec la présence de cuivre car l'addition d'acide citrique bloquant le cuivre fait disparaître l'action inhibitrice de la fraction soluble.

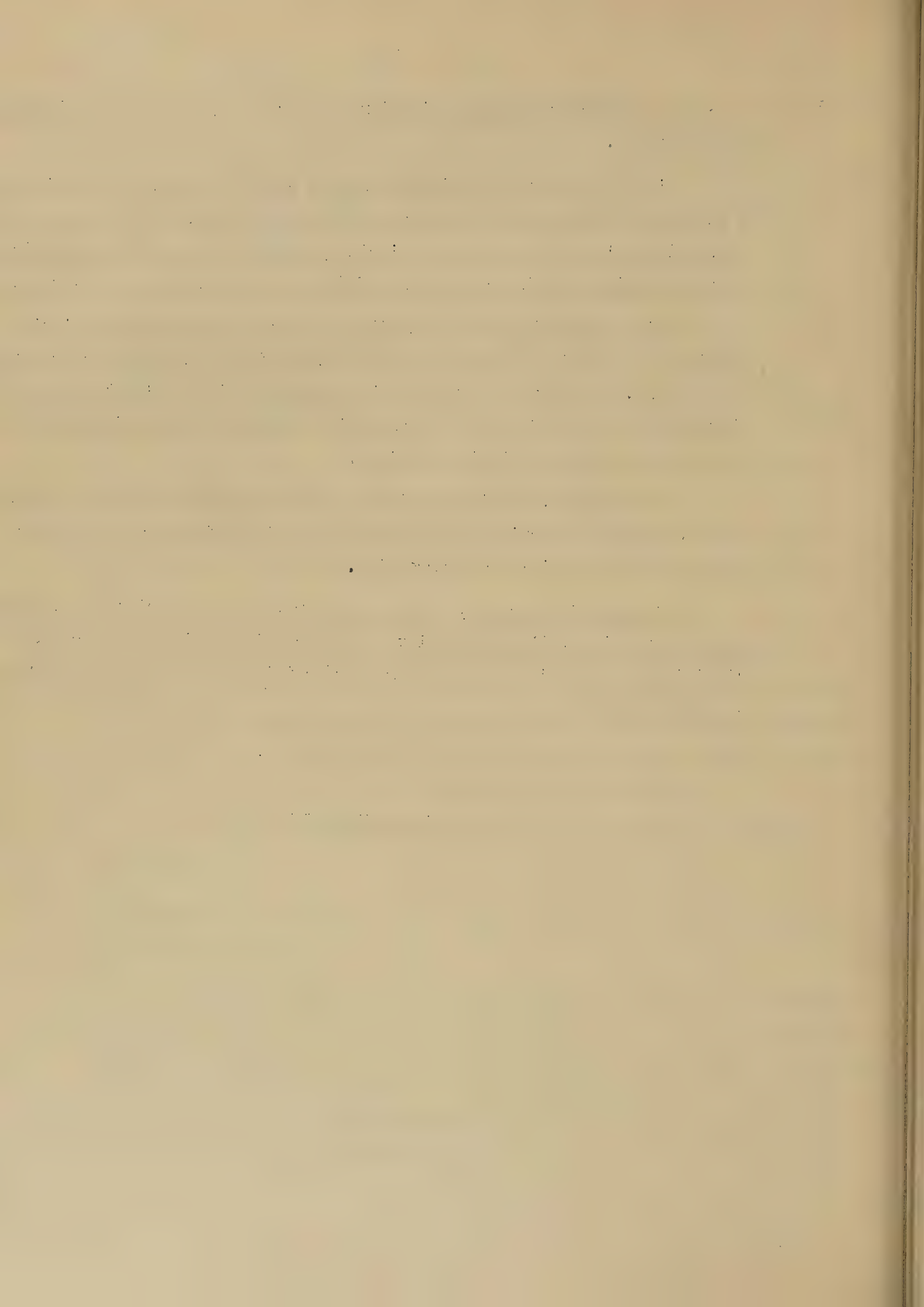
VI - Nous avons cherché à préciser l'action de l'acide phytique sur la phosphatase d'Amande.

L'acide phytique normalement présent dans les graines ne paraît pas y bloquer ou y masquer des phosphatases d'autres types. Une préparation de phosphatase d'Amande débarrassée d'acide phytique au cours de sa purification ne contient que la phosphatase II étudiée tout au long de ce travail.

Cette phosphatase II est inhibée de façon concurrente par l'acide phytique qui paraît se combiner de façon réversible à la fraction protéique de l'enzyme. Nous avons observé que la phosphatase II de l'Hellébore et la phosphatase III des feuilles de Marronnier étaient également inhibées de façon concurrente par l'acide phytique.

Par ailleurs, l'acide phytique, en se combinant aux cations bivalents, peut restreindre l'activation magnésienne ou l'inhibition calcique de la phosphatase des feuilles de marronnier.

Il apparaît donc que, dans les préparations de phosphatases végétales non purifiées, l'acide phytique est susceptible d'intervenir comme "inhibiteur naturel" et de modifier la réactivité de ces enzymes en présence de sels métalliques.



B I B L I O G R A P H I E

* * *

*

- (1) ALBERS D. - Zeitschr. physiol. Chem., 1940, 266, I.
- (2) ALBERS H. - Die Phosphatasen dans Handbuch der Enzymologie de NORD F.
et WEIDENHAGEN R. Leipzig, 1940.
- (3) AMBERT P. - Th. Doct. Univ. (Pharm.) Paris, 1929.
- (4) ANAGNOSTOPOULOS C. - Procès-Verbal Séance Soc. Chim. Biol. 3 Mars 1953.
- (5) ANAGNOSTOPOULOS C. et COURTOIS J. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31,
1504.
- (6) ARMENTANO L. - Biochem. Zeitschr., 1940, 307, 270.
- (7) ARTHUS M. et HUBER A. - C.R. Ac. Sc., 1892, 115, 839.
- (8) AXELROD B. - J. Biol. CHEM. 1948, 172, I.
- (9) BAILLY O. - Bull. Soc. Chim. France, 1919, 25, 240.
- (10) BAMANN E. - Ergebnisse der Enzymforschung, 1938, 7, 28.
- (11) BAMANN E. et DIEDERICHS K. - Ber. deutsch. chem. Gesell., 1934, 67,
1019.
- (12) BAMANN E. et RIEDEL E. - Zeitschr. physiol. Chem., 1934, 229, 125.
- (13) BAMANN E., RIEDEL E. et DIEDERICHS K. - Zeitschr. physiol. Chem.,
1934, 230, 175.
- (14) BARRE R. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1473.
- (15) BARRE R. - Th. Doct. Sc. phys., Paris, 1953.
- (16) BARRON G., DEMIO R. H. et KLEMPERER F. - J. biol. chem., 1935, 112, 625.
- (17) BELFANTI S., CONTARDI A. et ERCOLI E. - Biochem. J., 1935, 29, 517 et
842.
- (18) BESSE DE LAROMIGUIERE S. - Th. Doct. Univ. (Pharm.), Marseille, 1942.
- (19) BEZSSONOFF N. et WOLOSZYN M. - C.R. Soc. Biol., 1937, 125, 884.
- (20) BIGET P. - Th. Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1943.
- (21) BOOTH R. G. - Biochem. J., 1944, 38, 355.

- (22) BOSSARD M. - Th. Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1946.
- (23) BOUGAULT J. - J. Pharm. et Chim. 1917, 7, 97.
- (24) BREDERECK H. - Ber. deutsch. chem. Gesell., 1938, 71, 408.
- (25) BREDERECK H., BEUCHELT H. et RICHTER G. - Zeitschr. physiol. chem., 1936, 244, 102.
- (26) BREDERECK H. et GEYER E. - Zeitschr. Physiol. chem., 1938, 254, 223.
- (27) BREDERECK H. et MULLER G. - Ber. deutsch. chem. Gesell., 1939, 72, 115.
- (28) BORSOOK H. et DAVENPORT H. W. - J. Biol. chem., 1937, 117, 237.
- (29) CAVALIER J. - Bull. Soc. Chim. France, 1898, 19, 883.
- (30) CAVALIER J. et PROST E. - Bull. Soc. Chim. France, 1900, 23, 678.
- (31) CEDRANGOLO F. - Bull. Soc. ital. biol. sperim., 1935, 10, 374, et 1936, II, 140.
- (32) COURTOIS J. - Th. Doct. Sc. phys., Paris, 1938.
- (33) COURTOIS J. - Les esters phosphoriques des oses et holosides. Bull. Soc. chim. biol., 1941, 23, 133.
- (34) COURTOIS J. - J. Pharm. et Chim., 1936, 23, 232.
- (35) COURTOIS J. - Bull. Soc. Chim. biol., 1938, 20, 1359.
- (36) COURTOIS J. - Bull. Soc. Chim. biol., 1939, 20, 1376.
- (37) COURTOIS J. - J. Pharm. et Chim., 1939, 29, 433.
- (38) COURTOIS J. - Enzymologia, 1943 - 1945, 11, 313.
- (39) COURTOIS J. - Bull. Soc. chim. biol., 1943, 25, 363.
- (40) COURTOIS J. - Bull. Soc. chim. biol., 1948, 30, 37.
- (41) COURTOIS J. - Les esters phosphoriques de l'inositol. Bull. Soc. Chim. biol., 1951, 33, 1074.
- (42) COURTOIS J. et ANAGNOSTOPOULOS C. - Enzymologia, 1949, 13, 183.
- (43) COURTOIS J. et ANAGNOSTOPOULOS C. - Bull. Soc. Chim. biol. 1949, 31, 1494.
- (44) COURTOIS J., ANAGNOSTOPOULOS C. et KHORSAND M. - Bull. Soc. Chim. biol. 1951, 33, 1813.
- (45) COURTOIS J. et BARRE R. - Bull. Soc. Chim. biol., 1949, 31, 740.
- (46) COURTOIS J. et BARRE R. - Bull. Soc. Chim. biol., 1953, 35, 913.
- (47) COURTOIS J. et BIGET P. - Bull. Soc. Chim. biol., 1943, 25, 103.
- (48) COURTOIS J. et BOSSARD M. - Bull. Soc. Chim. biol., 1944, 26, 464.
- (49) COURTOIS J. et BOSSARD M. - Bull. Soc. Chim. biol., 1945, 27, 406.

- (50) COURTOIS J. et DENIS P. - Enzymologia, 1938, 5, 288.
- (51) COURTOIS J. et DENIS P. - Enzymologia, 1939, 6, 325.
- (52) COURTOIS J. et KHORSAND M. - Biochim. Biophys. Acta., 1950, 6, 175.
- (53) COURTOIS J. et MANET L. - Bull. Soc. Chim. biol. 1952, 34, 265.
- (54) COURTOIS J. et Mlle MANOUVRIER J. - C.R. Soc. biol. 1939, 131, 57.
- (55) COURTOIS J. et Mlle MANOUVRIER J. - Enzymologia, 1939, 6, 342.
- (56) COURTOIS J. et PEREZ Ch. - Bull. Soc. Chim. biol. 1949, 31, 1234.
- (57) COURTOIS J. et Mme RICAUD-MANOUVRIER J. - Bull. Soc. Chim. biol. 1943, 25, 211.
- (58) COURTOIS J. et Mme RICAUD-MANOUVRIER J. - Bull. Soc. Chim. biol. 1943, 25, 216.
- (59) COURTOIS J. et TRAN VAN AI - Bull. Soc. Chim. biol. 1953, 35, 721.
- (60) DAVIES D.R. - Biochem. J., 1934, 28, 529.
- (61) DELEPINE M. - Bull. Soc. Chim. biol. 1908, 3, 643.
- (62) DMOCHOWSKI A. - C.R. Soc. biol. 1933, 113, 956.
- (63) EDLBACHER S. et LEUTHARDT F. - Kli. Wochenschrift, 1933, 12, 1843.
- (64) ERDTMANN H. - Zeitschr. physiol. chem. 1927, 172, 182.
- (65) EULER H. von - Arkw. for Kem., 1935, 113, 6.
- (66) EULER H. von et HASSELQUIST H. - Reduktone. Edit. F. Enke Stuttgart, 1950.
- (67) EULER H. von, KARRER P. et ZEHENDER F. - Helv. Chim. Acta. 1934, 17, 157.
- (68) EULER H. von et MARTIUS C. - Liebigs. Ann., 1933, 505, 73.
- (69) EULER H. von, MYRBACK K. et LARSSON H. - Zeitschr. physiol. Chem. 1933, 217, I.
- (70) FALKENHAUSEN FREIHERR von - Biochem. Zeitschr., 1932, 253, 152.
- (71) FERNANDEZ O. et PIZARROSO A. - Chem. Centralblatt., 1928, 2, 60.
- (72) FLEURY P. - Th. Doct. Sc., Paris, 1924.
- (73) FLEURY P. - Bull. Soc. Chim. France, 1932, 5, 657.
- (74) FLEURY P. et BOUTOT L. - J. Pharm. et Chim., 1922, 26, 209.
- (75) FLEURY P. et COURTOIS J. - Enzymologia, 1937, I, 377.
- (76) FLEURY P. et COURTOIS J. - Enzymologia, 1938, 5, 254.
- (77) FLEURY P. et COURTOIS J. - Bull. Soc. Chim., France, 1941, 8, 69.

- (78) FLEURY P. et COURTOIS J. - Bull. Soc. Chim., France, 1941, 8, 75.
- (79) FLEURY P. et COURTOIS J. - Ann. Pharm., 1945, 3, 14.
- (80) FLEURY P. et COURTOIS J. - Biochim. Biophys. Acta, 1947, 3, 256.
- (81) FLEURY P., COURTOIS J., ANAGNOSTOPOULOS C. et DESJOBERT A. Bull. Soc. Chim. biol., 1950, 32, 771.
- (82) FLEURY P., COURTOIS J. et PLUMEL M. - Bull. Soc. Chim. biol. 1950, 32, 40.
- (83) FLEURY P. et LECLERC M. - Bull. Soc. Chim. biol., 1943, 25, 201.
- (84) FLEURY P. et PARIS R. - J. Pharm. et Chim., 1933, 18, 470.
- (85) FOLLEY S.J. et KAY H.D. - Ergebn. Enzymforschung, 1936, 5, 159.
- (86) GIRI K.V. - Biochem. Zeitschr., 1936, 285, 306.
- (87) GIRI K.V. - Zeitschr. physiol. chem., 1937, 245, 185.
- (88) GIRI K.V. - Zeitschr. physiol. chem., 1938, 254, 126.
- (89) GIRI K.V. - Biochem. J., 1939, 33, 309.
- (90) GIRI K.V. et DATTA N.C. - Biochem. J., 1936, 30, 1089.
- (91) GOLSE J. - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1931, 69, 270.
- (92) GULLAND J.M. et JACKSON E.M. - Biochem. J., 1938, 32, 590.
- (93) GULLAND J.M. et JACKSON E.M. - J. Chem. Soc. London, 1939, 2^o partie, 1842.
- (94) HANES C.S. - Biochem. J., 1935, 29, 2588.
- (95) HARDING V.J. - Proceed. Roy. Soc. London, 1912, série B, 85, 418.
- (96) HARTMANN M. et BOSSHARD W. - Helv. Chim. Acta, 1938, 21, 1554.
- (97) HEIWINKEL H. - Archiv. Kemi. Minéral. Geol., 1939, 13 A, n^o 19, 12.
- (98) HERBERT R.W., HIRST E.L., PERCIVAL E.G., REYNOLDS R.J. et SMITH F. - J. Chem. Soc. London, 1933, 136, 1270.
- (99) HERISSEY H. - Th. Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1899.
- (100) HESS A.F. et UNGER L.J. - J. biol. Chem., 1919, 35, 487.
- (101) HOFF - JORGENSEN E. - Det. Dansk. vid. Selsk., 1944, 21, n^o 7.
- (102) HOPKINS F.G. et MORGAN E.J. - Biochem. J., 1936, 30, 1447.
- (103) HORIUCHI K. - J. Biochem. Japan, 1931, 14, 163.
- (104) INOUE K. - J. Biochem. Japan, 1928, 10, 395.
- (105) JENNER H.D. et KAY H.D. - J. biol. Chem., 1931, 93, 733.
- (106) KARRER P. et SALOMON H. - Helv. Chim. Acta, 1933, 16, 181.
- (107) KELLIE A.E. et ZILVA S.S. - Biochem. J., 1935, 29, 1028.

- (108) KHORSAND M. - Th. Doct. Univ. Sc., Paris, 1951.
- (109) KIESE M. et HASTINGS A.B. - Science, 1938, 88, 242.
- (110) KING E.J. et DELORY E. - Biochem. J., 1938, 32, 1157.
- (111) KNOEVENAGEL C. - Biochem. Zeitschr., 1940, 305, 337.
- (112) KUBOWITZ F. - Biochem. Zeitschr., 1938, 296, 443, et 299, 32.
- (113) KUTSCHER W. - Zeitschr. physiol. chem., 1935, 235, 62.
- (114) KUTSCHER W. et WORNER A. - Zeitschr. physiol. chem., 1936, 239, 109.
- (115) KUTSCHER W. et WUST H. - Biochem. Zeitschr., 1941, 310, 292.
- (116) LANGLOIS J. et MORIN C. - Bull. Sc. Pharmacol., 1939, 46, 353.
- (117) LOFKIN, d'après SANNIEC. - Les virus protéines dans Exposés annuels
biochimie médicale, 2, Paris, 1939, Masson, édit.
- (118) LUERS H. et SIBEREISEN K. - Wschr. fur Brauerei, 1927, 44, 263.
- (119) LUNDSTEEN E. et VERMEHREN E. - Enzymologia, 1939, 6, 27.
- (120) LYMAN C.M., SCHULTZE O. et KING C.G. - J. biol. chem., 1937, 118, 757.
- (121) MAC COLLUM E.V. et HART E.B. - J. biol. chem., 1908, 4, 497.
- (122) MASCHMANN E. et HELMERT E. - Zeitschr. physiol. chem., 1936, 244, 56.
- (123) MAPSON L.W. - Biochem. J., 1946, 40, 240.
- (124) MENTZER C. - Bull. biologistes pharmaciens, 1938, n° 43, 518.
- (125) MINEMURA S. - J. Biochem. Japan, 1933, 17, 343.
- (126) NEUBERG C. - Biochem. Zeitschr., 1918, 88, 432.
- (127) NEUBERG C. et JACOBSON K. - Biochem. Zeitschr., 1927, 199, 498.
- (128) NEUBERG C. et MAND I. - Arch. Biochem., 1949, 23, 499.
- (129) NEUBERG C. et SCHWENK E. - Biochem. Zeitschr., 1915, 71, 104.
- (130) NGUYEN VAN THOAI - Bull. Soc., Chim. biol., 1941, 23, 1183.
- (131) NGUYEN VAN THOAI - Bull. Soc., Chim. biol., 1942, 24, 1077.
- (132) NGUYEN VAN THOAI - Bull. Soc., Chim. biol., 1942, 24, 1370.
- (133) OPPENHEIMER C. - Die Fermente und ihre wirkungen, suppl. I, III,
La Haye, 1936.
- (134) PARIS C. - Th. Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1936.
- (135) PAUCHARD E. - Journ. Pharm. Chim., 1926, 3, 248.
- (136) PEREZ C. - Th. Doct. Etat (Pharm.), Paris, 1949.
- (137) PETT L.B. et WYNNE A.M. - Biochem. J., 1933, 27, 1660.
- (138) PFANKUCH E. - Zeitschr. physiol. chem., 1936, 241, 34.
- (139) PIEN J. et MEINRATH H. - C.R. Ac. Sc., 1939, 209, 462.

- (140) PLUMEL M. - Bull. Soc. Chim. biol., 1948, 30, 55.
- (141) PLUMEL M. - Th. Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1948.
- (142) POSTERNAK S. - C.R. Ac. Sc., 1919, 168, 1216 et 169, 337.
- (143) PRATESI P. - Enzymologia, 1937, 4, 242.
- (144) PYLE J.B., FISCHER J.H. et CLARK R.H. - J. biol. chem., 1937, 119, 283.
- (145) RAPOPORT S., LEVA E. et GUEST G.M. - J. biol. chem., 1941, 139, 621.
- (146) ROBIQUET P. - Journ. Pharm. et Sc. access., 1838, 24, 196.
- (147) ROCHE J. et BULLINGER E. - Enzymologia, 1939, 7, 278.
- (148) ROCHE J. et COURTOIS J. - Exp. Ann. Biochim. Méd., Masson édit., Paris, 1944, 4, 219, à 284.
- (149) ROCHE J. et LATREILLE Mme M. - Enzymologia, 1937, 3, 75.
- (150) ROCHE J. et NGUYEN VAN THOAI - Bull. Soc. Chim. biol. 1942, 24, 1237.
- (151) ROCHE J. et NGUYEN VAN THOAI - Advanc. Enzymol., 1950, 10, 83.
- (152) ROCHE J., NGUYEN VAN THOAI et BAUDOIN Mlle J. - Bull. Soc. Chim. biol. 1942, 24, 1252.
- (153) SALOMON K. - Enzymologia, 1939, 6, 173.
- (154) SCHAFFNER A. et BAUER E. - Zeitschr. physiol. chem., 1934, 225, 245.
- (155) SCHAFFNER A. et BAUER E. - Zeitschr. physiol. chem., 1935, 232, 66.
- (156) SCHLENK F., GUNTHER G. et EULER H. von - Chem. Abstracts., 1938, 32, 7938.
- (157) SCHUSTER G. - Journ. Pharm. et Chim., 1935, 21, 32.
- (158) SHINOHARA K. - J. Pharm. Soc. Japan, 1938, 58, 279.
- (159) STRAUB F. - Zeitschr. physiol. chem., 1938, 254, 192.
- (160) STRATSCHITZKI K.I. - Chem. Centralblatt., 1941, 2^o série, 55.
- (161) SUZUKI U., YOSHIMURA K. et TAKAISHI M. - Chem. Centralblatt. 1907, 4^o vol., 1637.
- (162) SZENT GYORGYI A. - Biochem. J., 1928, 22, 1387.
- (163) SZENT GYORGYI A. et BANGA I. - Zeitschr. physiol. chem., 1938, 254, 165.
- (164) THANNHAUSER S.J., REICHEL M. et GRATTAN J.F. - J. biol. chem., 1938, 32, 1163.
- (165) THANNHAUSER S.J., REICHEL M., GRATTAN J.F. et MADDOCK S.J. - J. biol. chem., 1937, 121, 697, 709, 715, 721 et 727.
- (166) TSCHERNORUTZKY H. - Zeitschr. physiol. chem., 1912, 80, 298.

- (167) UZAWA S. - J. biochem. Japan, 1932, 15, I, II et 19.
- (168) VEIBEL S. - β glucosidase. Methodik der Fermentforschung de
BAMANN E. et MYRBACK K., Leipzig, 1940.
- (169) WALDSCHMITZ-LEITZ E. - J. Soc. chem. Ind., 1936, 55, 620.
- (170) WARBURG O. et CHRISTIAN W. - Biochem. Zeitschr., 1941, 310, 384.
- (171) WEIDENHAGEN R. - Article "Osidases" dans Handbuch der Enzymologie
de NORD F. et WEIDENHAGEN R., Leipzig, 1940.
- (172) WOEHLE F. et LIEBIG J. - Liebigs. Ann., 1837, 22, I.
- (173) YANG E.K. - Nature, 1940, 145, 745.

----- oOo -----

TABLE des MATIERES

	<u>Pages</u>
Introduction	8
 <u>Première Partie</u>	
Chapitre I. - La phosphatase d'Amande	10
Chapitre II. - Technique d'Etude de l'activité phosphatase	16
Chapitre III - Action de la phosphatase d'Amande en fonction du pH sur divers substrats	21
Chapitre IV - Affinité de la phosphatase d'Amande pour divers substrats	35
Chapitre V - Action de différents composés chimiques sur un certain nombre d'esters phosphoriques	40

Deuxième Partie

ACTION DES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE
SUR LA PHOSPHATASE D'AMANDÉ

Chapitre I - Action de divers oxydants	62
Chapitre II - Action inhibitrice du précipité cuivreux formé	84
Chapitre III - Etude de la fraction inhibitrice soluble .	93
Chapitre IV - Etude comparative de l'action de l'acide dioxymaléique et de ses produits d'oxydation sur la phosphatase d'Amande ...	109

Troisième Partie

Action de l'acide phytique sur les phosphatases	114
Conclusions	145
Bibliographie	150
Table des Matières	157
